

# cobas® EGFR Mutation Test v2

Pro diagnostické použití *in vitro*



**cobas® EGFR Mutation Test v2**

24 Tests P/N: 07248563190

Pro přípravu vzorků FFPE viz soupravu **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

Pro přípravu vzorků plazmy viz soupravu **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

## OBSAH

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Účel použití .....</b>                                       | <b>6</b>  |
| <b>Souhrn a výklad testu .....</b>                              | <b>7</b>  |
| Základní informace .....                                        | 7         |
| Principy postupu .....                                          | 9         |
| Příprava vzorků .....                                           | 9         |
| PCR amplifikace .....                                           | 9         |
| <b>ČÁST A: URČENO PRO POUŽITÍ SE VZORKY TKÁNĚ .....</b>         | <b>11</b> |
| <b>Materiály a činidla .....</b>                                | <b>11</b> |
| Materiály a činidla, která jsou součástí dodávky .....          | 11        |
| Uchovávání činidel a manipulace s nimi .....                    | 12        |
| Další potřebný materiál .....                                   | 13        |
| Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky ..... | 13        |
| <b>Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci .....</b>    | <b>13</b> |
| Varování a bezpečnostní opatření .....                          | 13        |
| Správná laboratorní praxe .....                                 | 14        |
| Kontaminace .....                                               | 14        |
| Integrita .....                                                 | 14        |
| Likvidace .....                                                 | 15        |
| Rozlití a čištění .....                                         | 15        |
| <b>Odběr, přeprava a uchovávání vzorků .....</b>                | <b>15</b> |
| Odběr vzorků .....                                              | 15        |
| Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků .....                   | 15        |
| Skladování a stabilita zpracovaných vzorků .....                | 15        |
| <b>Postup testu .....</b>                                       | <b>16</b> |
| Spuštění testu .....                                            | 16        |
| Návod k použití .....                                           | 16        |
| Velikost cyklu .....                                            | 16        |
| Kontrola celého procesu .....                                   | 16        |
| Izolace DNA .....                                               | 16        |
| Makrodisekce .....                                              | 17        |
| Kvantifikace DNA .....                                          | 17        |
| Amplifikace a detekce .....                                     | 17        |
| Nastavení přístroje .....                                       | 17        |
| Nastavení objednávky testu .....                                | 17        |
| Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku .....                      | 18        |
| Ředění vzorku .....                                             | 19        |

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Nastavení reakce .....                                                                       | 19        |
| Zahájení PCR .....                                                                           | 21        |
| <b>Výsledky .....</b>                                                                        | <b>22</b> |
| Vyhodnocení výsledků .....                                                                   | 22        |
| Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky .....                                       | 22        |
| Kontrola kvality a platnost výsledků .....                                                   | 23        |
| Kontrola mutace .....                                                                        | 23        |
| Negativní kontrola .....                                                                     | 23        |
| Procedurální omezení .....                                                                   | 23        |
| <b>Hodnocení neklinických funkčních parametrů .....</b>                                      | <b>24</b> |
| Analytická citlivost – limit slepého vzorku .....                                            | 24        |
| Mez detekce pomocí směsí vzorků FFPET .....                                                  | 24        |
| Minimální obsah nádoru .....                                                                 | 26        |
| Zkřížená reaktivita na jiné mutace na exonech 18, 19, 20 a 21 .....                          | 27        |
| Vzorky z klinického hodnocení EURTAC .....                                                   | 27        |
| Vzorky z klinického hodnocení AURA2 .....                                                    | 27        |
| Specifická – mikroorganismy a homology genu EGFR .....                                       | 27        |
| Plicní mikroorganismy .....                                                                  | 27        |
| Plazmidy homologů genu EGFR .....                                                            | 27        |
| Interference .....                                                                           | 28        |
| Nekrotická tkáň .....                                                                        | 28        |
| Opakovatelnost .....                                                                         | 28        |
| Reprodukovatelnost zacházení se vzorky .....                                                 | 28        |
| <b>Hodnocení klinických výsledků .....</b>                                                   | <b>29</b> |
| Klinická studie reprodukovatelnosti 1 .....                                                  | 29        |
| Klinická studie reprodukovatelnosti 2 .....                                                  | 30        |
| Korelace s referenční metodou s použitím vzorků fáze III z klinického hodnocení EURTAC ..... | 31        |
| Korelace s referenční metodou s použitím vzorků fáze II z klinického hodnocení AURA2 .....   | 33        |
| Výsledné klinické údaje .....                                                                | 34        |
| EURTAC .....                                                                                 | 34        |
| AURA2 .....                                                                                  | 35        |
| FLAURA .....                                                                                 | 36        |
| <b>ČÁST B: POUŽITÍ SE VZORKY PLAZMY .....</b>                                                | <b>40</b> |
| <b>Příprava vzorků .....</b>                                                                 | <b>40</b> |
| <b>Materiály a činidla .....</b>                                                             | <b>40</b> |
| Materiály a činidla, která jsou součástí dodávky .....                                       | 40        |
| Uchovávání činidel a manipulace s nimi .....                                                 | 41        |

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| Další potřebný materiál .....                                   | 42        |
| Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky ..... | 42        |
| <b>Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci .....</b>    | <b>43</b> |
| Varování a bezpečnostní opatření .....                          | 43        |
| Správná laboratorní praxe .....                                 | 43        |
| Kontaminace .....                                               | 43        |
| Integrita .....                                                 | 44        |
| Likvidace .....                                                 | 44        |
| Rozlití a čištění .....                                         | 44        |
| <b>Odběr, přeprava a uchovávání vzorků .....</b>                | <b>44</b> |
| Odběr vzorků a manipulace s nimi .....                          | 44        |
| Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků .....                   | 45        |
| Skládování a stabilita zpracovaných vzorků .....                | 45        |
| <b>Postup testu .....</b>                                       | <b>46</b> |
| Spuštění testu .....                                            | 46        |
| Návod k použití .....                                           | 46        |
| Velikost cyklu .....                                            | 46        |
| Kontrola celého procesu .....                                   | 46        |
| Izolace DNA .....                                               | 46        |
| Amplifikace a detekce .....                                     | 47        |
| Nastavení přístroje .....                                       | 47        |
| Nastavení objednávky testu .....                                | 47        |
| Nastavení reakce .....                                          | 48        |
| Zahájení PCR .....                                              | 49        |
| <b>Výsledky .....</b>                                           | <b>50</b> |
| Vyhodnocení výsledků .....                                      | 50        |
| Semikvantitativní index (SQI) .....                             | 50        |
| Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky .....          | 51        |
| Kontrola kvality a platnost výsledků .....                      | 51        |
| Kontrola mutace .....                                           | 51        |
| Negativní kontrola .....                                        | 51        |
| Procedurální omezení .....                                      | 51        |
| <b>Hodnocení neklinických funkčních parametrů .....</b>         | <b>53</b> |
| Analytické parametry .....                                      | 53        |
| Analytická citlivost – limit slepého vzorku .....               | 53        |
| Mez detekce pomocí DNA z buněčné linie .....                    | 53        |

|                                                                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Zkřížená reaktivita na jiné mutace na exonech 18, 19, 20 a 21 .....                                                                                           | 54        |
| Vzorky z prodloužení studie AURA a klinické studie AURA2 .....                                                                                                | 54        |
| Specifická – mikroorganismy .....                                                                                                                             | 54        |
| Interference .....                                                                                                                                            | 54        |
| Linearita .....                                                                                                                                               | 55        |
| Opakovatelnost .....                                                                                                                                          | 58        |
| <b>Hodnocení klinických výsledků .....</b>                                                                                                                    | <b>59</b> |
| Klinická reprodukovatelnost u plazmy K2 EDTA .....                                                                                                            | 59        |
| Klinická reprodukovatelnost u plazmy Roche cfDNA .....                                                                                                        | 60        |
| Mez detekce (LoD) s použitím vzorků plazmy NSCLC .....                                                                                                        | 61        |
| Korelace plazmy Roche cfDNA s plazmou K2 EDTA .....                                                                                                           | 62        |
| Korelace s referenční metodou s použitím vzorků plazmy fáze III z kohorty ASPIRATION .....                                                                    | 63        |
| Korelace mezi vzorky plazmy a tkáně použité v testu cobas EGFR pro detekci delece v exonu 19 a mutaci L858R s použitím vzorků ze studie ENSURE fáze III ..... | 64        |
| Korelace s referenční metodou s použitím vzorků fáze II z klinického hodnocení AURA2 .....                                                                    | 65        |
| Korelace mezi vzorky plazmy a tkáně při detekci mutace T790M s použitím vzorků ze studie AURA2 fáze II .....                                                  | 66        |
| Výsledné klinické údaje .....                                                                                                                                 | 67        |
| ENSURE .....                                                                                                                                                  | 67        |
| AURA2 .....                                                                                                                                                   | 69        |
| FLAURA .....                                                                                                                                                  | 70        |
| <b>Značky výsledků .....</b>                                                                                                                                  | <b>73</b> |
| Vysvětlení značek výsledků .....                                                                                                                              | 73        |
| <b>Doplňující informace .....</b>                                                                                                                             | <b>75</b> |
| Symboly .....                                                                                                                                                 | 75        |
| Technická podpora .....                                                                                                                                       | 76        |
| Výrobce .....                                                                                                                                                 | 76        |
| Ochranné známky a patenty .....                                                                                                                               | 76        |
| Autorská práva .....                                                                                                                                          | 76        |
| Literatura .....                                                                                                                                              | 77        |
| Revize dokumentu .....                                                                                                                                        | 79        |

## Účel použití

Test **cobas**® EGFR Mutation Test v2 je PCR test v reálném čase pro kvalitativní detekci definovaných mutací genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC). Definované mutace EGFR se detekují pomocí DNA izolované z formalínem stabilizovaných nádorových tkání v parafínu (FFPET) nebo volné cirkulující nádorové DNA (cfDNA) z plazmy získané z periferní plné krve s EDTA jako antikoagulantem.

Tento test je určen jako doprovodný diagnostický prostředek při výběru pacientů s NSCLC k léčbě inhibitory tyrozinkinázové aktivity EGFR (včetně cílených léčeb – viz Tab. 1 níže) v souladu s příbalovou informací schváleného léčivého přípravku:

Tab. 1

| Léčivo                  | FFPET                            | Plazma                           |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| TARCEVA® (erlotinib)    | Delece v exonu 19 a L858R        | Delece v exonu 19 a L858R        |
| TAGRISSO® (osimertinib) | Delece v exonu 19, L858R a T790M | Delece v exonu 19, L858R a T790M |
| IRESSA® (gefitinib)     | Delece v exonu 19 a L858R        | Delece v exonu 19 a L858R        |

Je testování vzorků plazmy nejvhodnější u pacientů, u nichž nelze provést biopsii nádoru. Pacienti, u nichž jsou výsledky tohoto testu s použitím vzorků plazmy pro tyto mutace negativní, musí absolvovat rutinní biopsii tkáně a testování mutací genu EGFR se vzorkem typu FFPET, je-li k dispozici.

Bezpečnost a účinnost přípravku nebyla stanovena pro následující mutace genu EGFR, které jsou také detekovány pomocí testu **cobas**® EGFR Mutation Test v2:

Tab. 2

| Léčivo                  | FFPET                                           | Plazma                                          |
|-------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| TARCEVA® (erlotinib)    | G719X, inzerce v exonu 20, T790M, S768I a L861Q | G719X, inzerce v exonu 20, T790M, S768I a L861Q |
| TAGRISSO® (osimertinib) | G719X, inzerce v exonu 20, S768I a L861Q        | G719X, inzerce v exonu 20, S768I a L861Q        |
| IRESSA® (gefitinib)     | G719X, inzerce v exonu 20, T790M, S768I a L861Q | G719X, inzerce v exonu 20, T790M, S768I a L861Q |

Test **cobas**® EGFR Mutation Test v2 pro použití se vzorky plazmy zahrnuje semikvantitativní měření mutace v exonech 18, 19, 20 a 21 genu EGFR. Toto měření, uváděné jako semikvantitativní index (SQI), koreluje s množstvím cílové mutantní cfDNA v plazmě a může se použít ke stanovení změn v náloži cílové mutantní cfDNA v průběhu času pro daného pacienta.

Pro manuální přípravu vzorků se vzorky FFPET zpracují pomocí soupravy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit a vzorky plazmy se zpracují pomocí soupravy **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit. Pro automatizovanou amplifikaci a detekci se používá analyzátor **cobas**® z 480.

# Souhrn a výklad testu

## Základní informace

Aktivační mutace v genu EGFR se vyskytují zvláště při NSCLC a to vede ke konstitutivní aktivaci kinázové aktivity bílkoviny EGFR, což přispívá k procesu onkogeneze.<sup>1</sup> Prevalence těchto mutací v náhodně zvolených případech NSCLC je asi 10–30 %.<sup>2,3</sup> Tyto mutace se však vyskytují častěji, ale ne výhradně, u nekuřáček či lehkých kuřáček asijského původu s histologicky prokázaným adenokarcinomem.<sup>4</sup>

Mezi nejčastější mutace genu EGFR u pacientů s NSCLC patří různé delece v exonu 19 a substituční mutace L858R v exonu 21; tyto mutace společně tvoří přibližně 85 % mutací EGFR pozorovaných u pacientů s NSCLC.<sup>5</sup> Test **cobas**® EGFR Mutation Test v2 (test **cobas** EGFR) je PCR test probíhající v reálném čase určený k detekci substitučních mutací G719X v exonu 18, delečních mutací v exonu 19, substitučních mutací T790M a S768I v exonu 20, inzerčních mutací v exonu 20 a substitučních mutací L858R a L861Q v exonu 21.

Test **cobas** EGFR se používá jako pomocný diagnostický test pro použití přípravku TARCEVA® (erlotinib), který reverzibilně inhibuje kinázovou aktivitu EGFR a brání autofosforylaci reziduí tyrosinu souvisejících s receptorem a tím inhibuje navazující signální dráhy, které podporují přežití buněk a proliferaci. Vazebná afinita přípravku TARCEVA® pro deleční mutace v exonu 19 genu EGFR nebo mutace v exonu 21 L858R je vyšší než afinita pro receptor genu divokého typu.<sup>6</sup> Při klinických hodnoceních se ukázalo, že v porovnání s pacienty léčenými pomocí chemoterapie je klinický přínos pravděpodobnější u pacientů s pokročilým NSCLC a delečními mutacemi v exonu 19 nebo substitučními mutacemi L858R v exonu 21, kteří byli léčeni přípravkem TARCEVA® jako léčbou první linie.<sup>3,7</sup>

Test **cobas** EGFR se používá jako pomocný diagnostický test pro použití přípravku TAGRISSO® (osimertinib), což je nereverzibilní inhibitor senzitivujících mutací EGFR TKI i rezistenčních mutací T790M u pacientů s pokročilým NSCLC. TAGRISSO® inhibuje kinázovou aktivitu EGFR, což inhibuje kaskádu nitrobuněčných navazujících signálních drah, které podporují buněčnou proliferaci, přežití a angiogenezi.<sup>8</sup> Při klinických hodnoceních se ukázalo, že klinický přínos je pravděpodobný u pacientů s pokročilým neskvamózním NSCLC se senzitivující mutací EGFR TKI, u nichž došlo k progresi po léčbě první generací EGFR TKI a u nichž se vytvořila rezistenční mutace T790M v exonu 20, kteří byli léčeni přípravkem TAGRISSO®.<sup>9</sup> Při klinickém hodnocení fáze III se ukázalo, že pacienti s pokročilými nádory NSCLC (pozitivní na deleci v exonu 19 nebo substituční mutaci v exonu 21 L858R), kteří byli léčeni přípravkem TAGRISSO® jako léčbou první linie, měli vyšší klinický přínos v porovnání s pacienty léčenými první generací EGFR TKI (gefitinib nebo erlotinib).<sup>10</sup>

Test **cobas** EGFR se používá jako pomocný diagnostický test pro použití přípravku IRESSA® (gefitinib), který reverzibilně inhibuje kinázovou aktivitu EGFR a brání autofosforylaci reziduí tyrosinu souvisejících s receptorem a tím inhibuje navazující signální dráhy, které podporují přežití buněk a proliferaci. Při klinických hodnoceních se ukázalo, že v porovnání s pacienty léčenými pomocí chemoterapie je klinický přínos pravděpodobnější u pacientů s pokročilým NSCLC a delečními mutacemi v exonu 19 nebo substitučními mutacemi L858R v exonu 21, kteří byli léčeni přípravkem IRESSA® jako léčbou první linie.<sup>11, 12, 13</sup>

Tab. 3 uvádí mutace EGFR detekované testem **cobas** EGFR.

Tab. 3 Test cobas EGFR je určen k detekci těchto mutací

| Exon    | Skupina mutace EGFR | Sekvence nukleové kyseliny EGFR | Nomenklatura proteinů HGVS*             | Nomenklatura nukleotidů HGVS*                     | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|---------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------|
| Exon 18 | G719X               | 2156G>C                         | LRG_304p1:p.(Gly719Ala)                 | LRG_304t1:c.2156G>C                               | 6239                    |
|         |                     | 2155G>A                         | LRG_304p1:p.(Gly719Ser)                 | LRG_304t1:c.2155G>A                               | 6252                    |
|         |                     | 2155G>T                         | LRG_304p1:p.(Gly719Cys)                 | LRG_304t1:c.2155G>T                               | 6253                    |
| Exon 19 | Ex19Del             | 2240_2251del12                  | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsSer)    | LRG_304t1:c.2240_2251delTAAGAGAAGCAA              | 6210                    |
|         |                     | 2239_2247del9                   | LRG_304p1:p.(Glu747_Glu749del)          | LRG_304t1:c.2239_2247delTTAAGAGAA                 | 6218                    |
|         |                     | 2238_2255del18                  | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAsp)    | LRG_304t1:c.2238_2255delATTAAGAGAAGCAACATC        | 6220                    |
|         |                     | 2235_2249del15                  | LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)          | LRG_304t1:c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC           | 6223                    |
|         |                     | 2236_2250del15                  | LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750del)          | LRG_304t1:c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA           | 6225                    |
|         |                     | 2239_2253del15                  | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)          | LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT           | 6254                    |
|         |                     | 2239_2256del18                  | LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752del)          | LRG_304t1:c.2239_2256delTTAAGAGAAGCAACATCT        | 6255                    |
|         |                     | 2237_2254del18                  | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsAla)    | LRG_304t1:c.2237_2254delAATTAAGAGAAGCAACAT        | 12367                   |
|         |                     | 2240_2254del15                  | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)          | LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT           | 12369                   |
|         |                     | 2240_2257del18                  | LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsSer)    | LRG_304t1:c.2240_2257delTAAGAGAAGCAACATCTC        | 12370                   |
|         |                     | 2239_2248TTAA GAGAAG>C          | LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)    | LRG_304t1:c.2239_2248delinsC                      | 12382                   |
|         |                     | 2239_2251>C                     | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsPro)    | LRG_304t1:c.2239_2251delinsC                      | 12383                   |
|         |                     | 2237_2255>T                     | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsVal)    | LRG_304t1:c.2237_2255delinsT                      | 12384                   |
|         |                     | 2235_2255>AAT                   | LRG_304p1:p.(Glu746_Ser752delinsIle)    | LRG_304t1:c.2235_2255delinsAAT                    | 12385                   |
|         |                     | 2237_2252>T                     | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsVal)    | LRG_304t1:c.2237_2252delinsT                      | 12386                   |
|         |                     | 2239_2258>CA                    | LRG_304p1:p.(Leu747_Pro753delinsGln)    | LRG_304t1:c.2239_2258delinsCA                     | 12387                   |
|         |                     | 2239_2256>CAA                   | LRG_304p1:p.(Leu747_Ser752delinsGln)    | LRG_304t1:c.2239_2256delinsCAA                    | 12403                   |
|         |                     | 2237_2253>TTGCT                 | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsValAla) | LRG_304t1:c.2237_2253delinsTTGCT                  | 12416                   |
|         |                     | 2238_2252>GCA                   | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751delinsGln)    | LRG_304t1:c.2238_2252delinsGCA                    | 12419                   |
|         |                     | 2238_2248>GC                    | LRG_304p1:p.(Leu747_Ala750delinsPro)    | LRG_304t1:c.2238_2248delinsGC                     | 12422                   |
|         |                     | 2237_2251del15                  | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsAla)    | LRG_304t1:c.2237_2251delAATTAAGAGAAGCAA           | 12678                   |
|         |                     | 2236_2253del18                  | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751del)          | LRG_304t1:c.2236_2253delGAATTAAGAGAAGCAACA        | 12728                   |
|         |                     | 2235_2248>AATTC                 | LRG_304p1:p.(Glu746_Ala750delinsIlePro) | LRG_304t1:c.2235_2248delinsAATTC                  | 13550                   |
|         |                     | 2235_2252>AAT                   | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIle)    | LRG_304t1:c.2235_2252delinsAAT                    | 13551                   |
|         |                     | 2235_2251>AATTC                 | LRG_304p1:p.(Glu746_Thr751delinsIlePro) | LRG_304t1:c.2235_2251delinsAATTC                  | 13552                   |
|         |                     | 2253_2276del24                  | LRG_304p1:p.(Ser752_Ile759del)          | LRG_304t1:c.2253_2276delATCTCCGAAAGCCAACAAG GAAAT | 13556                   |
|         |                     | 2237_2257>TCT                   | LRG_304p1:p.(Glu746_Pro753delinsValSer) | LRG_304t1:c.2237_2257delinsTCT                    | 18427                   |
|         |                     | 2238_2252del15                  | LRG_304p1:p.(Leu747_Thr751del)          | LRG_304t1:c.2240_2254delTAAGAGAAGCAACAT           | 23571                   |
|         |                     | 2233_2247del15                  | LRG_304p1:p.(Lys745_Glu749del)          | LRG_304t1:c.2233_2247delAAGGAATTAAGAGAA           | 26038                   |
| Exon 20 | S768I               | 2303G>T                         | LRG_304p1:p.(Ser768Ile)                 | LRG_304t1:c.2303G>T                               | 6241                    |
|         | T790M               | 2369C>T                         | LRG_304p1:p.(Thr790Met)                 | LRG_304t1:c.2369C>T                               | 6240                    |
|         | Ex20Ins             | 2307_2308ins9 GCCAGCGTG         | LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)          | LRG_304t1:c.2300_2308dupCCAGCGTGG                 | 12376                   |
|         |                     | 2319_2320insCAC                 | LRG_304p1:p.(His773dup)                 | LRG_304t1:c.2317_2319dupCAC                       | 12377                   |
|         |                     | 2310_2311insGGT                 | LRG_304p1:p.(Asp770_Asn771insGly)       | LRG_304t1:c.2310_2311insGGT                       | 12378                   |
|         |                     | 2311_2312ins9 GCGTGGACA         | LRG_304p1:p.(Ser768_Asp770dup)          | LRG_304t1:c.2303_2311dupGCGTGGACA                 | 13428                   |
|         |                     | 2309_2310AC> CCAGCGTGGAT        | LRG_304p1:p.(Ala767_Val769dup)          | LRG_304t1:c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT            | 13558                   |
| Exon 21 | L858R               | 2573T>G                         | LRG_304p1:p.(Leu858Arg)                 | LRG_304t1:c.2573T>G                               | 6224                    |
|         |                     | 2573_2574TG>GT                  | LRG_304p1:p.(Leu858Arg)                 | LRG_304t1:c.2573_2574delinsGT                     | 12429                   |
|         | L861Q               | 2582T>A                         | LRG_304p1:p.(Leu861Gln)                 | LRG_304t1:c.2582T>A                               | 6213                    |

\* HGVS – Human Genome Variation Society (Společnost pro variace lidského genomu)

## Principy postupu

Test **cobas** EGFR je založen na dvou základních postupech: (1) manuální příprava vzorku za účelem získání DNA z FFPET nebo plazmy a (2) PCR amplifikace a detekce cílové DNA pomocí komplementárních párů primerů a oligonukleotidových sond značených fluorescenčním barvivem. Test **cobas** EGFR je určen k detekci těchto mutací:

- Exon 18: G719X (G719A, G719C a G719S)
- Exon 19: delece a komplexní mutace (definované jako kombinace delece a inserce)
- Exon 20: S768I, T790M a inserce
- Exon 21: L858R a L861Q

Detekce mutací je dosaženo prostřednictvím PCR analýzy pomocí analyzátoru **cobas**® z 480. V každém cyklu je zařazena kontrola mutace a negativní kontrola pro potvrzení platnosti cyklu.

## Příprava vzorků

Soupravy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit a **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit jsou určeny pro manuální přípravu vzorků z FFPET a plazmy v uvedeném pořadí a jsou založené na vazbě nukleové kyseliny na skelná vlákna. Proteáza a chaotropní lytický/vazebný pufr uvolňují nukleové kyseliny a chrání uvolněnou DNA před působením DNáz. Následně je k lytické směsi přidán isopropanol a tato směs je pak centrifugována ve sloupci s filtrační vložkou ze skelného vlákna. Při centrifugaci je DNA navázána na povrch filtru ze skelného vlákna. Nenavázané substance, jako soli, bílkoviny a ostatní buněčné nečistoty, jsou odstraněny centrifugací. Adsorbované nukleové kyseliny jsou vymyty a poté eluovány vodným roztokem. V analyzátoru **cobas**® z 480 je amplifikována a detekována cílová DNA pomocí amplifikačních a detekčních činidel dodávaných v soupravě testu **cobas** EGFR.

## PCR amplifikace

### Volba cílové sekvence

Test **cobas** EGFR používá primery, které definují určité sekvence párů bází pro každou cílovou mutaci. Pro deleční mutace v exonu 19 jsou cílové sekvence v rozsahu 125 až 141 párů bází; pro substituční mutaci L858R v exonu 21 je cílová sekvence 138 párů bází; pro substituční mutaci T790M v exonu 20, je cílová sekvence 118 párů bází; pro substituční mutaci G719X v exonu 18 jsou cílové sekvence v rozsahu 104–106 párů bází; pro substituční mutaci S768I v exonu 20 je cílová sekvence 133 párů bází; pro inzerční mutace v exonu 20 jsou cílové sekvence v rozsahu 125 až 143 párů bází; pro substituční mutaci L861Q v exonu 21 je cílová sekvence 129 párů bází. Amplifikace probíhá pouze v oblastech genu EGFR mezi primery, celý gen EGFR amplifikován není.

### Amplifikace cíle

Pro amplifikaci cíle se používá derivát DNA polymerázy Z05-AS1 druhu *Thermus*. Nejdříve se směs PCR zahřeje za účelem denaturace DNA a tím se odhalí cílové sekvence pro primer. Během ochlazování směsi dochází k anelaci upstream a downstream primerů k sekvencím cílové DNA. DNA polymeráza Z05 za přítomnosti dvojmocných kovových kationtů a nadbytku dNTP každý anelovaný primer prodlužuje a syntetizuje se druhý řetězec DNA. Tím se ukončuje první cyklus PCR, který poskytuje dvouřetězcovou kopii DNA, která zahrnuje cílové oblasti párů bází genu EGFR. Tento proces se několikrát opakuje a v každém cyklu se efektivně zdvojnásobuje množství amplikonové DNA.

## Automatická detekce mutace v reálném čase

Test **cobas** EGFR využívá technologii PCR v reálném čase. Každá cílově specifická oligonukleotidová sonda v reakci je označena fluorescenčním barvivem, které slouží jako oznamovací, a další tlumicí molekulou, která absorbuje a tlumí fluorescenční emise z oznamovacího barviva v intaktní sondě. Během každého cyklu amplifikace se sonda komplementárně k jednovláknové DNA sekvenci v amplikonu váže a následně je rozštěpena 5' až 3' nukleázovou aktivitou DNA polymerázy Z05-AS1. Jakmile je pomocí této nukleázové aktivity separováno oznamovací barvivo od tlumicího barviva, je možné po excitaci oznamovacího barviva příslušným světelným spektrem měřit fluorescenční signál o specifické vlnové délce. K označování mutací, na které jsou testy zaměřeny, se používají čtyři různá oznamovací barviva. Amplifikace sedmi cílových sekvencí EGFR je detekována nezávisle ve třech reakcích měřením fluorescence při čtyřech charakteristických vlnových délkách v dedikovaných optických kanálech.

## Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny ze vzorku se dosahuje v testu **cobas** EGFR použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin trifosfátu (dUTP).<sup>15</sup> Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin, ale nikoliv DNA obsahující thymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu, díky použití dUTP namísto deoxythymidin trifosfátu jako jednoho z nukleotid trifosfátu v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminující amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Enzym AmpErase, který je obsažený v činidlech Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribózového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku při alkalickém pH zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je při teplotách nad 55 °C, to je během fází tepelného cyklu, neaktivní, a proto terčový amplikon nerozkládá. Bylo prokázáno, že test **cobas** EGFR inaktivoval mutantní amplikon EGFR obsahující deoxyuridin.

**U VZORKŮ TKÁNĚ POSTUPOJTE PODLE POKYNŮ V ČÁSTI A.**

**U VZORKŮ PLAZMY POSTUPOJTE PODLE POKYNŮ V ČÁSTI B.**

## ČÁST A: URČENO PRO POUŽITÍ SE VZORKY TKÁNĚ

Pro izolaci DNA ze vzorků tkáně viz soupravu **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190).

### Materiály a činidla

#### Materiály a činidla, která jsou součástí dodávky

| Soupravy/Kazety                                                           | Součásti a složky činidel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Množství na test | Bezpečnostní symboly a varování |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------|
| <b>cobas® EGFR<br/>Mutation Test v2</b><br>24 testů<br>(M/N: 07248563190) | <b>EGFR MMX-1</b><br>(EGFR Master Mix 1)<br>(M/N 06471366001)<br>Tris pufr<br>Chlorid draselný<br>Glycerol<br>EDTA<br>Tween 20<br>3,13 % dimetylsulfoxid<br>0,09 % azid sodný<br>< 0,10 % dNTPs<br>< 0,01 % Z05-AS1 DNA polymeráza (mikrobiální)<br>< 0,01 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)<br>(mikrobiální)<br>< 0,01 % Aptamer<br>< 0,01 % upstream a downstream EGFR primery<br>< 0,01 % fluorescenčně značené sondy EGFR | 2 × 0,48 ml      | N/A                             |
|                                                                           | <b>EGFR MMX-2</b><br>(EGFR Master Mix 2)<br>(M/N 06471382001)<br>Tris pufr<br>Chlorid draselný<br>Glycerol<br>EDTA<br>Tween 20<br>3,13 % dimetylsulfoxid<br>0,09 % azid sodný<br>< 0,10 % dNTPs<br>< 0,01 % Z05-AS1 DNA polymeráza (mikrobiální)<br>< 0,01 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)<br>(mikrobiální)<br>< 0,01 % Aptamer<br>< 0,01 % upstream a downstream EGFR primery<br>< 0,01 % fluorescenčně značené sondy EGFR | 2 × 0,48 ml      | N/A                             |

| Soupravy/Kazety                                                   | Součásti a složky činidel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Množství na test | Bezpečnostní symboly a varování |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------|
| cobas® EGFR<br>Mutation Test v2<br>24 testů<br>(M/N: 07248563190) | <b>EGFR MMX-3 v2</b><br>(EGFR Master Mix 3)<br>(M/N 07248610001)<br>Tris pufr<br>Chlorid draselný<br>Glycerol<br>EDTA<br>Tween 20<br>3,13 % dimetylsulfoxid<br>0,09 % azid sodný<br>< 0,10 % dNTPs<br>< 0,01 % Z05-AS1 DNA polymeráza (mikrobiální)<br>< 0,01 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)<br>(mikrobiální)<br>< 0,01 % Aptamer<br>< 0,01 % upstream a downstream EGFR primery<br>< 0,01 % fluorescenčně značené sondy EGFR | 2 × 0,48 ml      | N/A                             |
|                                                                   | <b>MGAC</b><br>(Octan hořečnatý)<br>(M/N 05854326001)<br>Octan hořečnatý<br>0,09 % azid sodný                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 6 × 0,2 ml       | N/A                             |
|                                                                   | <b>EGFR MC</b><br>(Kontrola mutace EGFR)<br>(M/N 06471455001)<br>Tris pufr<br>EDTA<br>Poly-rA RNA (syntetická)<br>0,05 % azid sodný<br>< 0,1 % plazmid DNA obsahující exon 18, 19, 20<br>a 21 sekvence genu EGFR (mikrobiální)<br>< 0,1 % DNA divokého typu genu EGFR (buněčná<br>kultura)                                                                                                                                             | 6 × 0,1 ml       | N/A                             |
|                                                                   | <b>DNA SD</b><br>(Roztok pro ředění vzorků DNA)<br>(M/N 05854474001)<br>Pufr Tris-HCl<br>0,09 % azid sodný                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2 × 3,5 ml       | N/A                             |

## Uchovávání činidel a manipulace s nimi

| Činidlo                       | Teplota uchovávání | Doba uchovávání                                                                                                                      |
|-------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cobas® EGFR Mutation Test v2* | 2 °C až 8 °C       | Po otevření je stabilní pro 4 použití po dobu 90 dní nebo dokud nevypřší vyznačená doba použitelnosti, podle toho, co nastane dříve. |

\* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** a pracovní MMX (připravený přidáním **MGAC** do **EGFR MMX-1** nebo **EGFR MMX-2** nebo **EGFR MMX-3 v2**) musí být chráněny před delším vystavením světlu. Pracovní MMX je nutné uchovávat při teplotě 2 °C až 8 °C ve tmě. Připravené vzorky a kontroly musí být přidány během 1 hodiny od přípravy pracovního MMX. S amplifikací je třeba začít do 1 hodiny od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního MMX.

## Další potřebný materiál

| Materiál                                                                                     | M/N                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| cobas® DNA Sample Preparation Kit                                                            | Roche 05985536190   |
| Bělidlo                                                                                      | Kterýkoli dodavatel |
| 70% etanol                                                                                   | Kterýkoli dodavatel |
| Mikrotitrační destička pro systém cobas® 4800 (AD destička) a zalepovací fólie               | Roche 05232724001   |
| Aplikátor zalepovací fólie pro systém cobas® 4800 (dodávaný s instalací systému cobas® 4800) | Roche 04900383001   |
| Nastavitelné pipetory* (objem 5–1000 µl)                                                     | Kterýkoli dodavatel |
| Aerosolová bariéra nebo pipetovací špičky s přímým vypuzováním bez DNázy                     | Kterýkoli dodavatel |
| Zkumavky do mikrocentrifugy s víčkem s pojistkou (1,5ml sterilní, bez RNázy/DNázy, pro PCR)  | Kterýkoli dodavatel |
| Stojany na zkumavky do mikrocentrifugy                                                       | Kterýkoli dodavatel |
| Spektrofotometr pro měření koncentrace DNA*                                                  | Kterýkoli dodavatel |
| Vířivý mixér (Vortex)*                                                                       | Kterýkoli dodavatel |
| Rukavice na jedno použití bez pudru                                                          | Kterýkoli dodavatel |
| Mraznička umožňující dosahovat teplot –25 °C až –15 °C                                       | Kterýkoli dodavatel |

\* Veškeré vybavení je nutné udržovat podle pokynů výrobce.

Více informací ohledně samostatně prodávaných materiálů získáte u svého místního zástupce společnosti Roche.

## Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky

| Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky                     |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| Analyzátor cobas® z 480                                                       |
| Řídicí jednotka systému cobas® 4800 se softwarem systému verze 2.2 nebo vyšší |
| EGFR Tissue P1 Analysis Package softwarový verze 1.0 nebo vyšší*              |
| Čtečka čárového kódu s USB                                                    |
| Tiskárna                                                                      |

\* Aktuální verzi softwaru naleznete v kartě s informacemi o výrobku k sadě cobas® EGFR Mutation Test v2 (M/N: 07335873001).

Více informací ohledně samostatně prodávaných materiálů získáte u svého místního zástupce společnosti Roche.

## Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci

### Varování a bezpečnostní opatření

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe.

- Pouze pro účely diagnostiky *in vitro*.
- Bezpečnostní listy (SDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- Tento test je určen pouze pro vyšetřování vzorků tkání FFPET NSCLC. Vzorky by měly být považovány za infekční materiál a manipulace s nimi by měla být prováděna podle bezpečných laboratorních postupů, které jsou uvedeny v publikaci Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>16</sup> a v dokumentu CLSI číslo M29-A4.<sup>17</sup>
- Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a špičky na pipety bez DNázy.

## Správná laboratorní praxe

- Nepipetujte ústy.
- V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte.
- Po práci se vzorky a činidly si důkladně umyjte ruce.
- Při práci s jakýmkoliv činidly používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Pokud dojde k rozlití, zřed'te je před vytřením dosucha vodou.
- Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5 % roztokem chlornanu sodného v destilované nebo deionizované vodě (zředěný bělicí prostředek pro domácnosti 1:10). Dále povrch otřete 70% etanolem.

**Pozn.:** běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný o koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

## Kontaminace

- Je nutné nosit rukavice. Aby nedošlo ke kontaminaci, musí se rukavice vyměňovat mezi manipulací se vzorky a manipulací s činidly testu **cobas** EGFR. Vyvarujte se kontaminaci rukavic při zacházení se vzorky.
- Aby se snížila možnost kontaminace, je nutné často měnit rukavice.
- Rukavice se musí vyměnit před opuštěním prostor určených pro izolaci DNA nebo v případě podezření, že došlo ke kontaktu s roztoky nebo vzorky.
- Zamezte mikrobiální a ribonukleázové kontaminaci činidel.
- Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou MMX pečlivě vyčistit. Přístroje a potřebné pomůcky by měly být určeny pro každý z těchto kroků samostatně a neměly by být použity pro jinou činnost ani přenášeny. Např. pipetory a spotřební materiál používané pro izolaci DNA se nesmí používat k přípravě činidel pro amplifikaci a detekci.
- Velmi doporučujeme jednosměrný pracovní postup – zahájit nový krok až po kompletním dokončení předchozího kroku. Např. před amplifikací a detekcí je nutné dokončit izolaci DNA. Izolaci DNA je nutné provést na jiném místě než amplifikaci a detekci. Aby nedošlo ke kontaminaci pracovního Master Mixu vzorky DNA, je nutné před přípravou pracovního Master Mixu pečlivě vyčistit pracovní plochu.

## Integrita

- Nepoužívejte soupravy po uplynutí data použitelnosti.
- Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav nebo šarží.
- Položky k jednorázovému použití nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Všechny položky k jednorázovému použití použijte jen jednou. Nepoužívat opakovaně.
- Veškeré vybavení je nutné řádně udržovat podle pokynů výrobce.

## Likvidace

- **MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC a DNA SD** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím studené vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.

## Rozlití a čištění

- Pokud dojde k rozlití na přístroj **cobas® 4800**, postupujte při čištění podle pokynů v příslušném Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.
- Pro čištění analyzátoru **cobas® z 480** nepoužívejte roztok chlornanu sodného (bělidlo). Vyčistěte analyzátor **cobas® z 480** podle postupů popsanych v příslušném Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.
- Další varování, upozornění a postupy pro snížení nebezpečí kontaminace analyzátoru **cobas® z 480** najdete v návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo v Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.

## Odběr, přeprava a uchovávání vzorků

*Pozn.: se všemi vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními.*

### Odběr vzorků

Vzorky NSCLC FFPET byly validovány pro použití s testem **cobas** EGFR.

### Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků

Vzorky NSCLC FFPET je možné přepravovat při teplotě 15 °C až 30 °C. Při přepravě vzorků FFPET je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy pro přepravu infekčních biologických materiálů.<sup>18</sup>

Byla potvrzena stabilita vzorků FFPET po dobu až 12 měsíců od data odběru při uchování při teplotě 15 °C až 30 °C. 5µm řezy na sklíčkách je možné uchovávat při teplotě 15 °C až 30 °C až po dobu 60 dní.

Vzorky FFPET jsou stabilní:

| Typ vzorku FFPET                | Bloček FFPET   | 5µm řez FFPET  |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| Teplota uchovávání vzorků FFPET | 15 °C až 30 °C | 15 °C až 30 °C |
| Doba uchovávání                 | Až 12 měsíců   | Až 60 dní      |

### Skladování a stabilita zpracovaných vzorků

Zpracované vzorky (extrahovaná DNA) jsou stabilní po následující dobu:

| Teplota uchovávání extrahované DNA | –15 °C až –25 °C                                  | 2 °C až 8 °C | 15 °C až 30 °C |
|------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------|----------------|
| Doba uchovávání                    | Až 3 cykly zmrazení a rozmrazení v průběhu 60 dní | Až 14 dní    | Až 1 den       |

Extrahovanou DNA je nutné použít v doporučené době uchovávání nebo před datem expirace soupravy pro přípravu vzorků **cobas®** DNA Sample Preparation Kit, podle toho, co nastane dříve.

# Postup testu

## Spuštění testu

Obrázek 1 Pracovní postup testu cobas EGFR se soupravou cobas® DNA Sample Preparation Kit

|    |                                                         |
|----|---------------------------------------------------------|
| 1  | Spusťte systém.                                         |
| 2  | Proveďte údržbu přístroje.                              |
| 3  | Odstraňte vzorky a činidla z místa uchovávání.          |
| 4  | Zbavte vzorky parafínu.                                 |
| 5  | Proveďte izolaci DNA.                                   |
| 6  | Eluujte DNA.                                            |
| 7  | Vytvořte objednávku a vytiskněte rozložení destičky.    |
| 8  | Připravte amplifikační činidla.                         |
| 9  | Nadávkujte amplifikační činidla na AD destičku.         |
| 10 | Nadávkujte vzorky na AD destičku.                       |
| 11 | Zalepte AD destičku.                                    |
| 12 | Vložte AD destičku do analyzátoru <b>cobas® z 480</b> . |
| 13 | Spusťte cyklus.                                         |
| 14 | Zkontrolujte výsledky.                                  |
| 15 | S LIS: odešlete výsledky do LIS.                        |
| 16 | Vyprázdněte analyzátor.                                 |

## Návod k použití

**Pozn.:** v testech mutace genu **cobas EGFR** lze používat pouze řezy NSCLC FFPET o tloušťce 5 µm jejichž plochu tvoří alespoň z 10 % nádor. U vzorků, kde nádor představuje méně než 10 % plochy, je nutné po deparafinizaci provést makrodisekci.

**Pozn.:** viz Návod k použití systému **cobas® 4800** nebo asistent uživatele systému **cobas® 4800**, kde najdete podrobné pokyny pro analyzátor **cobas® z 480**.

## Velikost cyklu

Jeden cyklus může zahrnovat 1 až 30 vzorků (plus kontroly) na mikrotitrační destičce s 96 jamkami. Při zpracování více než 24 vzorků bude nutné použít více souprav testů **cobas EGFR**.

Test **cobas EGFR** obsahuje množství činidel dostatečné pro testování 3 vzorků v 8 cyklech (plus kontroly), tj. maximálně 24 vzorků na soupravu.

## Kontrola celého procesu

Tento test vyžaduje negativní kontrolu pro celý proces. Pro každý cyklus zpracujte negativní kontrolu současně se vzorkem či vzorky počínaje od postupu **izolace DNA**.

## Izolace DNA

DNA je izolována ze vzorků FFPET s **cobas® DNA Sample Preparation Kit** (M/N 05985536190).

## Makrodisekce

Jestliže vzorek podle plochy obsahuje méně než 10 % nádoru, musí být provedena makrodisekce vzorku jako součást přípravy vzorku.

## Kvantifikace DNA

**Pozn.:** měření koncentrace DNA je nutné provést před uchováváním okamžitě po izolaci DNA.

**Pozn.:** zásobní DNA skladujte podle pokynů v části **Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků**.

1. Každou zásobní DNA míchejte vířením po dobu 5 sekund.
2. Spektrofotometrem kvantifikujte DNA podle protokolu výrobce. Použijte **DNA EB** ze soupravy **cobas® DNA Sample Preparation Kit** jako slepý vzorek pro přístroj. Průměrně jsou nutná dvě konzistentní měření. Když budou hodnoty koncentrace DNA  $\geq 20,0$  ng/ $\mu$ l, tato dvě měření by se měla vzájemně lišit o  $\pm 10$  % hodnoty. Při koncentraci DNA  $< 20,0$  ng/ $\mu$ l musí být tato dvě měření v rozmezí  $\pm 2$  ng/ $\mu$ l. Pokud hodnoty těchto dvou měření nejsou vůči sobě v rozsahu  $\pm 10$  %, když jsou koncentrace DNA  $\geq 20,0$  ng/ $\mu$ l nebo v rozsahu  $\pm 2$  ng/ $\mu$ l, když jsou koncentrace DNA  $< 20,0$  ng/ $\mu$ l, je nutné provést další dvě měření, dokud nebude dosaženo daných požadavků. Poté je nutné vypočítat průměr těchto dvou měření.

**Pozn.:** zásobní DNA ze zpracovaných negativních kontrol (**NEG**) není nutné měřit.

3. Aby bylo možné provést test **cobas EGFR**, musí být koncentrace zásobní DNA ze vzorků  $\geq 2$  ng/ $\mu$ l. Každý vzorek projde 3× amplifikací/detekcí. Pro každou amplifikaci/detekci se použije 25  $\mu$ l roztoku zásobní DNA zředěného na koncentraci 2 ng/ $\mu$ l (celkem 50 ng DNA).

**Pozn.:** aby bylo možné provést test **cobas EGFR**, každá zásobní DNA musí mít minimální koncentraci 2 ng/ $\mu$ l. Pokud je koncentrace zásobní DNA  $< 2$  ng/ $\mu$ l, je nutné deparafinizaci, izolaci DNA a kvantifikaci DNA pro tento vzorek opakovat s použitím dvou 5  $\mu$ m FFPET řezů. U vzorků na sklíčcích po deparafinizaci smíchejte tkáň z obou řezů do jedné zkumavky, ponořte tkáň do **TLB + PK** ze soupravy **cobas® DNA Sample Preparation Kit** a proveďte izolaci DNA a kvantifikaci podle popisu výše. U vzorků bez sklíčků smíchejte tkáň z obou řezů do jedné zkumavky a proveďte deparafinizaci, izolaci DNA a kvantifikaci. Pokud je koncentrace zásobní DNA stále  $< 2$  ng/ $\mu$ l, vyžádejte si další řez vzorku FFPET z dodávacího klinického pracoviště.

## Amplifikace a detekce

**Pozn.:** aby nedošlo ke kontaminaci pracovního MMX vzorky DNA, musí se amplifikace a detekce provádět v místě odděleném od izolace DNA. Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou MMX pečlivě vyčistit. Při pečlivém vyčištění je nutné všechny stojany a pipetory řádně otřít 0,5% roztokem chlornanu sodného a poté otřít 70% roztokem etanolu. Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný o koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

## Nastavení přístroje

Viz Návod k použití systému **cobas® 4800** nebo Asistent uživatele systému **cobas® 4800**, kde najdete podrobné pokyny pro nastavení analyzátoru **cobas® z 480**.

## Nastavení objednávky testu

Podrobné pokyny k pracovnímu postupu EGFR naleznete v Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo v Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.

Vytvořte rozvržení destičky, na které budou pozice všech vzorků a kontrol cyklu. V cyklu, který obsahuje pouze vzorky tkáně, se kontrola mutace (MC) umístí na destičku na pozici **A01–A03**. Negativní kontrola (**NEG**) se vloží na destičku na 07340761001-08CS

pozice **B01–B03**. Zředěné vzorky se poté přidají v sadách po třech sloupcích počínaje **C01–C03** až **H10–H12**, viz Obrázek 2.

Test **cobas** EGFR může být prováděn v kombinovaném režimu testování (např. EGFR tkáň s EGFR plazmou). Pozice kontrol se mohou lišit podle vybraných testů a čísel vzorků. Další podrobnosti o nastavení cyklu kombinovaného testu naleznete v Návodu k použití systému **cobas**® 4800 nebo v Asistentu uživatele systému **cobas**® 4800.

**Obrázek 2 Rozvržení destičky pro test cobas EGFR**

| Řada / Sloupec | 01           | 02           | 03                 | 04           | 05           | 06                 | 07           | 08           | 09                 | 10           | 11           | 12                 |
|----------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|
| <b>A</b>       | MC<br>MMX 1  | MC<br>MMX 2  | MC<br>MMX 3<br>v2  | S7<br>MMX 1  | S7<br>MMX 2  | S7<br>MMX 3<br>v2  | S15<br>MMX 1 | S15<br>MMX 2 | S15<br>MMX 3<br>v2 | S23<br>MMX 1 | S23<br>MMX 2 | S23<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>B</b>       | NEG<br>MMX 1 | NEG<br>MMX 2 | NEG<br>MMX 3<br>v2 | S8<br>MMX 1  | S8<br>MMX 2  | S8<br>MMX 3<br>v2  | S16<br>MMX 1 | S16<br>MMX 2 | S16<br>MMX 3<br>v2 | S24<br>MMX 1 | S24<br>MMX 2 | S24<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>C</b>       | S1<br>MMX 1  | S1<br>MMX 2  | S1<br>MMX 3<br>v2  | S9<br>MMX 1  | S9<br>MMX 2  | S9<br>MMX 3<br>v2  | S17<br>MMX 1 | S17<br>MMX 2 | S17<br>MMX 3<br>v2 | S25<br>MMX 1 | S25<br>MMX 2 | S25<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>D</b>       | S2<br>MMX 1  | S2<br>MMX 2  | S2<br>MMX 3<br>v2  | S10<br>MMX 1 | S10<br>MMX 2 | S10<br>MMX 3<br>v2 | S18<br>MMX 1 | S18<br>MMX 2 | S18<br>MMX 3<br>v2 | S26<br>MMX 1 | S26<br>MMX 2 | S26<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>E</b>       | S3<br>MMX 1  | S3<br>MMX 2  | S3<br>MMX 3<br>v2  | S11<br>MMX 1 | S11<br>MMX 2 | S11<br>MMX 3<br>v2 | S19<br>MMX 1 | S19<br>MMX 2 | S19<br>MMX 3<br>v2 | S27<br>MMX 1 | S27<br>MMX 2 | S27<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>F</b>       | S4<br>MMX 1  | S4<br>MMX 2  | S4<br>MMX 3<br>v2  | S12<br>MMX 1 | S12<br>MMX 2 | S12<br>MMX 3<br>v2 | S20<br>MMX 1 | S20<br>MMX 2 | S20<br>MMX 3<br>v2 | S28<br>MMX 1 | S28<br>MMX 2 | S28<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>G</b>       | S5<br>MMX 1  | S5<br>MMX 2  | S5<br>MMX 3<br>v2  | S13<br>MMX 1 | S13<br>MMX 2 | S13<br>MMX 3<br>v2 | S21<br>MMX 1 | S21<br>MMX 2 | S21<br>MMX 3<br>v2 | S29<br>MMX 1 | S29<br>MMX 2 | S29<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>H</b>       | S6<br>MMX 1  | S6<br>MMX 2  | S6<br>MMX 3<br>v2  | S14<br>MMX 1 | S14<br>MMX 2 | S14<br>MMX 3<br>v2 | S22<br>MMX 1 | S22<br>MMX 2 | S22<br>MMX 3<br>v2 | S30<br>MMX 1 | S30<br>MMX 2 | S30<br>MMX 3<br>v2 |

Kde: MC = kontrola mutace, NEG = negativní kontrola, S# = ID vzorku a MMX # odpovídá činidlu Master Mix 1, 2 nebo 3 v2.

**Pozn.:** aby byla získána odpověď, musí být každý vzorek rozdělen mezi tři sousední sloupce v jedné řadě.

**Pozn.:** pracovní Master Mix 1 musí být na destičce ve sloupcích 01, 04, 07 a 10. pracovní Master Mix 2 musí být na destičce ve sloupcích 02, 05, 08 a 11. Pracovní Master Mix 3 v2 musí být na destičce ve sloupcích 03, 06, 09 a 12.

**Pozn.:** na jednu destičku je možné dát až 30 vzorků. Jestliže je ke zpracování všech vzorků na destičce nutná více než jedna souprava činidel, všechny soupravy činidel musí být ze stejné šarže.

## Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku

### Výpočet ředění zásobní DNA při koncentracích od 2 ng/μl do 36 ng/μl

**Pozn.:** zásobní DNA ze vzorků je nutné ředit bezprostředně před amplifikací a detekcí.

**Pozn.:** pro každý vzorek jsou provedeny tři amplifikace/detekce vyžadující celkem 75 μl (25 μl pro každou ze tří reakcí) zásobní DNA zředěné na koncentraci 2 ng/μl (celkem 150 ng DNA).

- Pro každý vzorek vypočítejte objem (μl) potřebné zásobní DNA:

$$\text{Objem zásobní DNA v } \mu\text{l} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div \text{koncentrace zásobní DNA [ng}/\mu\text{l}]$$

- Pro každý vzorek vypočítejte objem (μl) potřebné **DNA SD**:

$$\mu\text{l DNA SD} = 90 \mu\text{l} - \mu\text{l zásobní DNA}$$

Příklad:

$$\text{Koncentrace zásobní DNA} = 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$1. \mu\text{l zásobní DNA} = (90 \mu\text{l} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 6,5 \text{ ng}/\mu\text{l} = 27,7 \mu\text{l}$$

$$2. \mu\text{l DNA SD} = (90 \mu\text{l} - 27,7 \mu\text{l}) = 62,3 \mu\text{l}$$

**Výpočet ředění zásobní DNA při koncentracích > 36 ng/μl**

**Pozn.:** zásobní DNA ze vzorků je nutné ředit bezprostředně před amplifikací a detekcí.

**Pozn.:** pro každý vzorek jsou provedeny tři amplifikace/detekce vyžadující celkem 75 μl (25 μl pro každou ze tří reakcí) zásobní DNA zředěné na koncentraci 2 ng/μl (celkem 150 ng DNA).

1. Při koncentraci zásobní DNA > 36 ng/μl používejte následující vzorec pro výpočet množství **DNA SD** požadovaného k přípravě alespoň 90 μl zředěné zásobní DNA. Díky tomu každý vzorek použije minimálně 5 μl zásobní DNA.
2. Pro každý vzorek vypočítejte objem (μl) **DNA SD** potřebný k ředění 5 μl zásobní DNA na 2 ng/μl:

$$\text{Objem potřebného DNA SD v } \mu\text{l} = [(5 \mu\text{l} \text{ zásobní DNA} \times \text{konc. zásobní DNA v ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l}$$

Příklad:

$$\text{Koncentrace zásobní DNA} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

1. Objem požadovaného **DNA SD** v μl =  $[(5 \mu\text{l} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{l}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{l}] - 5 \mu\text{l} = 245 \mu\text{l}$
2. Použijte vypočtený objem **DNA SD** k ředění 5 μl zásobní DNA.

**Ředění vzorku**

1. Připravte si příslušné množství 1,5ml zkumavek pro mikrocentrifugu s víčkem s pojistkou pro ředění zásobní DNA a označte je příslušnou identifikací vzorku.
2. Pomocí pipetoru se špičkou bránící vzniku aerosolů napipetujte vypočtené objemy **DNA SD** do každé označené zkumavky. Napipetujte 45 μl **DNA SD** do zkumavky pro mikrocentrifugu s víčkem s pojistkou označené **NEG**.
3. Vířte každou zásobní DNA a negativní kontrolu po dobu 5 až 10 sekund.
4. Pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou (pro každé pipetování použijte novou špičku) opatrně napipetujte vypočtený objem každé zásobní DNA do příslušně značené zkumavky obsahující **DNA SD**. Do zkumavky **NEG** napipetujte 45 μl negativní kontroly (extrahovaný eluát).
5. Zkumavky uzavřete a každou nechte 5 až 10 sekund vířit.
6. Vyměňte rukavice.

**Nastavení reakce****Příprava pracovních Master Mixů (MMX-1, MMX-2 a MMX-3 v2)**

**Pozn.:** **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** a pracovní **MMX** jsou citlivé na světlo a je nutné je chránit před dlouhodobým působením světla.

**Pozn.:** vzhledem k viskozitě činidel **EGFR MMX** a pracovního **MMX** pipetujte pomalu, aby došlo k vypuzení veškeré směsi ze špičky.

**Pozn.:** **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2** a **EGFR MMX-3 v2** se mohou zdát světle modré/nařítovělé. To nemá vliv na účinnost činidel.

Do jednotlivých 1,5ml zkumavek pro mikrocentrifugu s víčkem s pojistkou připravte tři pracovní **MMX**, jednu s obsahem **EGFR MMX-1**, jednu s obsahem **EGFR MMX-2** a jednu s obsahem **EGFR MMX-3 v2**.

1. Vypočítejte objem požadovaného **EGFR MMX-1** nebo **EGFR MMX-2** nebo **EGFR MMX-3 v2** pro každý pracovní **MMX** pomocí následujícího vzorce:  
$$\text{Objem požadovaného EGFR MMX-1 nebo EGFR MMX-2 nebo EGFR MMX-3 v2} = (\text{počet vzorků} + 2 \text{ kontroly} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$
2. Vypočítejte objem potřebného **MGAC** pro každý pracovní **MMX** pomocí následujícího vzorce:  
$$\text{Objem požadovaného MGAC} = (\text{počet vzorků} + 2 \text{ kontroly} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Tab. 4 se používá k stanovení objemu každého činidla potřebného pro přípravu pracovního MMX na základě počtu vzorků v cyklu.

**Tab. 4 Objemy činidel potřebných pro pracovní MMX-1, pracovní MMX-2 a pracovní MMX-3 v2**

|                                           |       | Počet vzorků* |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------|-------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                           |       | 1             | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
| MMX                                       | 20 µl | 80            | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 | 200 | 220 | 240 | 260 |
| MGAC                                      | 5 µl  | 20            | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  | 50  | 55  | 60  | 65  |
| Celkový objem každého pracovního MMX (µl) |       | 100           | 125 | 150 | 175 | 200 | 225 | 250 | 275 | 300 | 325 |

\* Objem pro počet vzorků je založen na součtu počtu vzorků + 2 kontroly + 1.

3. Vyjměte příslušný počet lahvíček **EGFR MMX-1**, **EGFR MMX-2**, **EGFR MMX-3 v2** a **MGAC** z místa uchovávání o teplotě 2 °C až 8 °C. Před použitím každé činidlo míchejte 5 sekund vířením, a shromážděte kapalinu ve spodní části zkumavky. Označte sterilní zkumavku pro mikrocentrifugu pro pracovní MMX-1, pracovní MMX-2 a pracovní MMX-3 v2.
4. Přidejte vypočítaný objem **EGFR MMX-1** nebo **EGFR MMX-2** nebo **EGFR MMX-3 v2** do odpovídajících zkumavek pro pracovní MMX.
5. Přidejte vypočtený objem **MGAC** do zkumavek s pracovním MMX.
6. Zkumavky vířením po dobu 3 až 5 sekund promíchejte, aby došlo k dostatečnému promíchání.

**Pozn.:** vzorky a kontroly je nutné dát na AD-destičku do jedné hodiny po přípravě pracovních MMX.

**Pozn.:** používejte pouze AD destičku pro systém **cobas® 4800** se zalepovací fólií.

### Příprava destičky

1. Do každé reakční jamky na AD destičce, která je potřebná pro cyklus, přidejte 25 µl pracovního MMX. Špička pipety se nesmí dotknout destičky mimo danou jamku.
  - Do jamek AD destičky ve sloupcích 01, 04, 07 a 10 přidejte podle potřeby pracovní MMX-1 (obsahující **EGFR MMX-1**).
  - Do jamek AD destičky ve sloupcích 02, 05, 08 a 11 přidejte podle potřeby pracovní MMX-2 (obsahující **EGFR MMX-2**).
  - Do jamek AD destičky ve sloupcích 03, 06, 09 a 12 přidejte podle potřeby pracovní MMX-3 v2 (obsahující **EGFR MMX-3 v2**).
2. Napipetujte 25 µl **EGFR MC** do jamek **A01**, **A02** a **A03** AD destičky; pipetou dobře promíchejte – nasajte a vytlačte z pipety v jamce alespoň dvakrát.
3. Pomocí nové pipetovací špičky napipetujte 25 µl **NEG** do jamek **B01**, **B02** a **B03** na AD destičce a pomocí pipety dobře promíchejte – nasajte a vytlačte z pipety v jamce alespoň dvakrát.

**Pozn.:** každý cyklus musí obsahovat **EGFR MC** v jamkách **A01**, **A02** a **A03** a **NEG** v jamkách **B01**, **B02** a **B03**.  
V opačném případě analyzátor **cobas®** z 480 cyklus zneplatní.

**Pozn.:** podle potřeby měňte rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci mezi vzorky a kontaminaci PCR reakční zkumavky zvnějšku.

4. Pomocí nových pipetovacích špiček pro každý nařazený vzorek DNA přidejte 25 µl prvního vzorku DNA do jamek **C01**, **C02** a **C03** na AD destičce; pro přidání vzorku DNA do každé jamky použijte novou špičku; pomocí pipety každou jamku dobře promíchejte – nasajte a vytlačte z pipety v jamce alespoň dvakrát. Opakujte postup pro DNA z každého vzorku a postupujte podle šablony Obrázek 2, dokud nebudou ředění všech vzorků DNA umístěna na AD destičku. Ujistěte se, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamek.

5. Zalepte AD destičku zalepovací fólií (dodanou s destičkami). Pomocí aplikátoru zalepovací fólie přilepte zalepovací fólii pevně k AD destičce.
6. Před zahájením PCR se ujistěte, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamek.

**Pozn.:** amplifikace a detekce musí začít do 1 hodiny od okamžiku přidání prvního ředění vzorku DNA do pracovního MMX.

## Zahájení PCR

Podrobné pokyny ke krokům pracovního postupu EGFR naleznete v Návodu k použití systému **cobas®** 4800 nebo v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800. Jakmile se objeví vyskakovací okno „Select test“, vyberte „EGFR Tissue P1“ a klikněte na tlačítko „OK“.

# Výsledky

## Vyhodnocení výsledků

**Pozn.:** veškerou validaci cyklů a vzorků provádí software **cobas® 4800**.

**Pozn.:** platný cyklus může zahrnovat jak platné tak i neplatné výsledky vzorků.

Jestliže je cyklus platný, lze výsledky vzorků interpretovat způsobem který uvádí Tab. 5.

**Tab. 5 Interpretace výsledků testu cobas EGFR**

| Výsledky testu              | Výsledek mutace                                                                                              | Interpretace                                                                                                                                                       |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mutation Detected           | Ex19Del<br>S768I<br>L858R<br>T790M<br>L861Q<br>G719X<br>Ex20Ins<br>(Může být přítomna více než jedna mutace) | Byla detekována mutace ve specifické cílové oblasti EGFR.                                                                                                          |
| No Mutation Detected (NMD)* | N/A                                                                                                          | Nedošlo k detekci mutace v cílových oblastech EGFR                                                                                                                 |
| Invalid                     | N/A                                                                                                          | Výsledek vzorku je neplatný. Opakujte testování vzorků s neplatnými výsledky podle pokynů v části níže<br><b>Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky.</b> |
| Failed                      | N/A                                                                                                          | Neúspěšný cyklus způsobený poruchou hardwaru nebo softwaru. Vyžádejte si od místního zastoupení společnosti Roche technickou pomoc.                                |

\* Výsledek „No Mutation Detected“ nevylučuje přítomnost mutace v cílových oblastech EGFR, protože výsledky závisí na procentním množství mutantních sekvencí, integritě příslušného vzorku, nepřítomnosti inhibitorů a dostatečném množství detekované DNA.

Značky (příznaky) výsledků lze najít na záložce „Results“ (Výsledky) (obrazovka) nebo ve sloupci „Flags“ (Příznaky) (zpráva). Více podrobností naleznete v části viz část **Značky výsledků**.

## Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky

- Opakujte ředění neplatné zásobní DNA ze vzorku od postupu „Výpočet ředění zásobní DNA ze vzorku“ a „Ředění vzorků“ v části **Amplifikace a detekce**.
- Po zředění zásobní DNA na koncentraci 2 ng/μl, jak je uvedeno v „Ředění vzorků“ pokračujte částí „Příprava pracovních Master Mixů (MMX-1, MMX-2 a MMX-3 v2)“ a zbývající částí postupu amplifikace a detekce.

**Pozn.:** jestliže je vzorek po opakovaném testování stále neplatný nebo nebylo dostatečné množství zásobní DNA pro přípravu dalšího ředění v kroku 1 části **Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky**, opakujte celý test s daným vzorkem počínaje deparafinizací a izolací DNA s novým 5μm řezem FFPE nádoru.

## Kontrola kvality a platnost výsledků

Každý cyklus pro až 30 vzorků zahrnuje jednu sadu kontrol mutace testu **cobas** EGFR (**EGFR MC**) (jamky **A01**, **A02** a **A03**) a negativních kontrol (**NEG**) (jamky **B01**, **B02** a **B03**) pro pracovní MMX-1, pracovní MMX-2 a pracovní MMX-3 v2. Cyklus je platný, pokud jsou **EGFR MC** a **NEG** platné. Pokud jsou **EGFR MC** nebo **NEG** neplatné, je celý cyklus neplatný a musí se zopakovat. Čerstvě si nařed'te již dříve izolovanou zásobní DNA ze vzorku a připravte si novou AD destičku s kontrolami pro amplifikaci a detekci.

### Kontrola mutace

Výsledek **EGFR MC** musí být „Valid“. Pokud jsou výsledky kontroly **EGFR MC** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

### Negativní kontrola

Výsledek kontroly **NEG** musí být „Valid“. Pokud jsou výsledky kontroly **NEG** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

## Procedurální omezení

1. Testujte pouze indikované typy vzorků. Test **cobas** EGFR byl validován pro použití jen se vzorky FFPET NSCLC.
2. Test **cobas** EGFR byl validován jen se soupravou **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (Roche P/N: 05985536190).
3. Detekce mutace závisí na tom, kolik kopií genu je ve vzorku přítomno, a vliv mohou mít i integrita vzorku, množství izolované DNA a přítomnost interferenčních látek.
4. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy fixace vzorků, transportu, skladování a zpracování vzorků. Postupujte podle procedur v Návodu k použití soupravy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) v tomto Návodu k použití, v Návodu k použití systému **cobas**® 4800 nebo Asistentu uživatele systému **cobas**® 4800.
5. Vlivy jiných proměnných, jako jsou proměnné fixace vzorku, hodnoceny nebyly.
6. Přidání enzymu AmpErase k činidlu Master Mix testu **cobas** EGFR umožňuje selektivní amplifikaci cílové DNA. Aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy uvedené v tomto návodu k použití.
7. Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v technikách PCR a v používání systému **cobas**® 4800.
8. Pouze analyzátor **cobas**® z 480 byl validován pro použití s tímto produktem. S tímto produktem se nesmí používat žádný jiný termocykler s optickou detekcí v reálném čase.
9. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem k jiné technologii provedli ve své laboratoři korelační metodické studie a posoudili rozdíly mezi technologiemi.
10. Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.
11. I když vzácně, mutace v oblastech genomické DNA genu EGFR pokryté primery a/nebo sondami testu **cobas** EGFR mohou vést k selhání detekce mutace v exonech 18, 19, 20 a 21 (výsledek „No Mutation Detected“).
12. Test **cobas** EGFR vykazuje zkříženou reaktivitu (výsledek „Mutation Detected“) u mutace L747S v exonu 19, což je vzácně se vyskytující mutace, která může způsobit rezistenci vůči léčbě TKI.<sup>19</sup>
13. Test **cobas** EGFR je schválen k použití s 50 ng DNA na reakční jamku. Nedoporučuje se použití menšího množství DNA než 50 ng na reakční jamku.
14. Test **cobas** EGFR je kvalitativní test. Test neslouží pro kvantitativní měření procentuální mutace.

15. Vzorky NSCLC FFPET s degradovanou DNA mohou ovlivnit schopnost testu detekovat mutace EGFR.
16. Vzorky s výsledky „No Mutation Detected“ mohou obsahovat mutace EGFR, které tento test nedetekuje.
17. Test **cobas** EGFR detekuje mutace EGFR u pacientů s NSCLC, jejichž nádory mají substituce v exonu 18 (G719X), delece v exonu 19, inserce a substituce v exonu 20 (T790M, S768I) a substituce v exonu 21 (L858R, L861Q), ale žádné jiné mutace EGFR.

## Hodnocení neklinických funkčních parametrů

**Pozn.:** níže uvedené popisy studií zahrnují kumulativní data shromážděná s testy **cobas** EGFR v1 a v2.

U níže uvedených neklinických studií byl obsah nádoru v procentech stanoven při patologickém zkoumání. Pro výběr vzorků pro testování byla použita obousměrná Sangerova sekvenační metoda a sekvenování nové generace (NGS). Obsah mutace v procentech ve vzorku NSCLC FFPET byl stanoven pomocí metody NGS.

### Analytická citlivost – limit slepého vzorku

Pro vyhodnocení účinnosti testu **cobas** EGFR v případě absence templátu a pro ujištění se, že slepý vzorek negeneruje analytický signál, který by mohl ukazovat na nízkou koncentraci mutace, byly vyhodnoceny vzorky bez templátu a vzorky EGFR NSCLC FFPET divokého typu. Pomocí analýzy předepsané v pokynech CLSI EP17-A2<sup>20</sup> byl limit slepého vzorku stanoven jako nulový pro všechny mutace.

### Mez detekce pomocí směsí vzorků FFPET

Tři extrakty DNA ze vzorku FFPET delece exonu 19, čtyři extrakty DNA ze vzorku FFPET mutace L858R, dva extrakty DNA ze vzorku FFPET s duální mutací L858R a T790M, dva extrakty DNA ze vzorku FFPET mutace G719A, jeden extrakt DNA ze vzorku FFPET duální mutace T790M a G719A, jeden extrakt DNA ze vzorku FFPET duální mutace G719C a S768I, jeden extrakt DNA ze vzorku FFPET duální mutace S768I a G719S, tři extrakty DNA ze vzorku FFPET inserční mutace v exonu 20 a tři extrakty DNA ze vzorku FFPET mutace L861Q byly smíšeny s extrakty ze vzorku FFPET divokého typu genu EGFR a takto byly získány vzorky pro cílové úrovně mutací 10, 5,0, 2,5 a 1,25 % určené metodou sekvenování nové generace (NGS), která byla schválená pro detekci mutací genu EGFR v exonech 18, 19, 20 a 21. Byly připraveny série ředění každé směsi vzorku a bylo testováno osm replikátů každého člena panelu s použitím tří šarží sad testu **cobas** EGFR (n = 24/člen panelu). Mez detekce každého vzorku byla stanovena nejnižším množstvím DNA, které mělo míru pozitivitu cílové mutace EGFR „Mutation Detected“ alespoň 95 %, viz Tab. 6.

Tab. 6 Mez detekce testu cobas EGFR s použitím směsí vzorků FFPET

| Exon EGFR | Skupina mutace EGFR | Sekvence nukleové kyseliny EGFR | Procenta mutací u členů panelu k získání pozitivní mutace „Mutation Detected“<br>≥ 95 % cílové mutace s 50 ng DNA na reakční jamku (N = 24 replikátů) | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|-----------|---------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 18        | G719X               | 2156 G>C                        | 2,5                                                                                                                                                   | 6239                    |
|           |                     | 2156 G>C                        | 4,7                                                                                                                                                   | 6239                    |
|           |                     | 2155 G>A                        | 3,2                                                                                                                                                   | 6252                    |
|           |                     | 2155 G>T                        | 5,6                                                                                                                                                   | 6253                    |
| 19        | Exon 19 delece      | 2235_2249del15                  | 1,4                                                                                                                                                   | 6223                    |
|           |                     | 2236_2250del15                  | 2,5                                                                                                                                                   | 6225                    |
|           |                     | 2239_2256del18*                 | 4,7                                                                                                                                                   | 6255                    |
|           |                     | 2240_2254del15                  | 7,2                                                                                                                                                   | 12369                   |
|           |                     | 2240_2257del18                  | 13,4**                                                                                                                                                | 12370                   |
|           |                     | 2239_2248>C                     | 2,2                                                                                                                                                   | 12382                   |
|           |                     | 2237_2255>T*                    | 4,1                                                                                                                                                   | 12384                   |
|           |                     | 2237_2253>TTGCT*                | 6,3                                                                                                                                                   | 12416                   |
|           |                     | 2238_2252del15                  | 2,4                                                                                                                                                   | 23571                   |
|           |                     | 2238_2252del15*                 | 5,5                                                                                                                                                   | 23571                   |
|           |                     | 2239_2257>GT*                   | 6,0                                                                                                                                                   | Nenalezeno              |
| 20        | T790M               | 2369 C>T                        | 2,0                                                                                                                                                   | 6240                    |
|           |                     | 2369 C>T                        | 2,4                                                                                                                                                   | 6240                    |
|           |                     | 2369 C>T                        | 3,0                                                                                                                                                   | 6240                    |
|           | S768I               | 2303 G>T                        | 1,3                                                                                                                                                   | 6241                    |
|           |                     | 2303 G>T                        | 2,4                                                                                                                                                   | 6241                    |
|           | Exon 20 inzerce     | 2307_2308insGCCAGCGTG           | 1,7                                                                                                                                                   | 12376                   |
|           |                     | 2319_2320insCAC                 | 6,8                                                                                                                                                   | 12377                   |
|           |                     | 2310_2311insGGT                 | 1,3                                                                                                                                                   | 12378                   |
| 21        | L858RP              | 2573 T>G                        | 4,0                                                                                                                                                   | 6224                    |
|           |                     | 2573 T>G                        | 4,2                                                                                                                                                   | 6224                    |
|           |                     | 2573 T>G                        | 4,3                                                                                                                                                   | 6224                    |
|           |                     | 2573 T>G                        | 4,3                                                                                                                                                   | 6224                    |
|           |                     | 2573 T>G                        | 5,3                                                                                                                                                   | 6224                    |
|           | L861Q               | 2582T>A                         | 2,1                                                                                                                                                   | 6213                    |
|           |                     | 2582T>A                         | 2,2                                                                                                                                                   | 6213                    |
|           |                     | 2582T>A                         | 3,4                                                                                                                                                   | 6213                    |

\* Pouze jedna hladina cílená na přibližně 5% hladinu mutace byla testována na tyto často se nevyskytující mutace delece v exonu 19 v kohortě EURTAC. Směsi vzorků DNA byly testovány na 3 pracovištích studie.

\*\* Mez detekce testu **cobas** EGFR pro tuto mutaci je vyšší než 10% hladina mutace při použití standardní koncentrace 50 ng na reakční jamku.

Tato studie ukazuje, že test **cobas** EGFR dokáže detekovat mutace exonu 18, 19, 20 a 21 genu EGFR při hladině mutace alespoň 5 % při použití standardní koncentrace 50 ng na reakční jamku.

## Minimální obsah nádoru

Pro stanovení minimálního obsahu nádoru v tkáni potřebného pro detekci mutace genu EGFR ve vzorcích NSCLC bylo testováno celkem 66 nezávislých vzorků s mutací genu EGFR (tj. 35 vzorků s delecí v exonu 19 a 31 vzorků s mutací L858R v exonu 21) s obsahem nádoru od 25 do 99 %. Žádný z hodnocených vzorků neměl delecí v exonu 19 a zároveň mutaci L858R v exonu 21. Každý vzorek byl testován před provedením makrodisekce (čistě) a po provedení makrodisekce. Zjištěné hodnoty CtR čistých vzorků a vzorků po provedení makrodisekce byly analyzovány pomocí Demingovy regrese a analýzy dle Blanda a Altmana (rozdíl vs. průměr). Výsledky podporují použití vzorků, jejichž obsah nádoru je vyšší než 25 % bez provedení makrodisekce.

Kvůli zjištění, zda by makrodisekce nádorové tkáně NSCLC s nízkým procentním obsahem nádoru zlepšila vyhodnocení testu **cobas** EGFR, bylo testováno dalších 10 EGFR NSCLC vzorků divokého typu (s obsahem nádoru 1–90 %) a 10 vzorků mutace genu EGFR (s obsahem nádoru 8–95 %). Každý vzorek byl testován před provedením makrodisekce (čistě) a po provedení makrodisekce. Všechny výsledky s provedenou makrodisekcí odpovídaly výsledkům bez provedené makrodisekce a u všech 20 vzorků byly zjištěny očekávané výsledky pro mutace a divoký typ.

V klinickém hodnocení chemoterapie založené na erlotinibu vs. cisplatině EURTAC, fáze III, u vzorků NSCLC FFPET s obsahem nádoru méně než 10 % byla před analýzou mutace EGFR provedena makrodisekce. Podskupina screeningových vzorků EURTAC byla vyhodnocená na stav mutace genu EGFR jak pomocí testu **cobas** EGFR, tak i sekvenováním nové generace (NGS). Tab. 7 a Tab. 8 zahrnují vzorky NSCLC s platnými párovými výsledky mutace genu EGFR v exonu 19 nebo mutace L858R dohromady jak z testu **cobas** EGFR, tak i sekvenování NGS. Při použití NGS jako referenční metody výsledky ukázaly, že makrodisekce řezů NSCLC FFPET s obsahem nádoru menším než 10 % přináší srovnatelnou analytickou přesnost jako řezy NSCLC FFPET bez makrodisekce.

Spolu tyto studie podporují myšlenku, že před testováním mutace pomocí testu **cobas** EGFR je nutná makrodisekce pro řezy NSCLC FFPET s obsahem nádoru menším než 10 %.

**Tab. 7 Účinnost testu cobas EGFR pro vzorky NSCLC FFPET s obsahem nádoru ≤ 10 % (po makrodisekci)**

| Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 97,2 % (35/36)      | 85,8 %, 99,5 % |
| Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 94,5 % (52/55)      | 85,1 %, 98,1 % |
| Celková procentní shoda (OPA)            | 95,6 % (87/91)      | 89,2 %, 98,3 % |

**Tab. 8 Účinnost testu cobas EGFR pro vzorky NSCLC FFPET s obsahem nádoru > 10 % (bez makrodisekce)**

| Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 93,0 % (107/115)    | 86,9 %, 96,4 % |
| Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 98,5 % (199/202)    | 95,7 %, 99,5 % |
| Celková procentní shoda (OPA)            | 96,5 % (306/317)    | 93,9 %, 98,1 % |

## Zkřížená reaktivita na jiné mutace na exonech 18, 19, 20 a 21

### Vzorky z klinického hodnocení EURTAC

Test **cobas** EGFR ukázal výsledky „Mutation Detected“ pro následující mutace genu EGFR pozorované na vzorcích z klinického hodnocení EURTAC (Tab. 9). Analytické funkční parametry testu **cobas** EGFR při detekci těchto mutací nebyly hodnoceny.

Tab. 9 Mutace detekované v kohortě EURTAC, u nichž byla zjištěna zkřížená reakce s testem **cobas** EGFR

| Exon | Sekvence mutace   | Změna aminokyselin | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| 19   | 2236_2252>AT      | E746_T751>I        | 26680                   |
|      | 2239_2253>CAA     | L747_T751>Q        | 51527                   |
|      | 2234_2251>AAT     | K745_T751>K        | Nenalezeno              |
|      | 2236_2244del9     | E746_R748>E        | Nenalezeno              |
|      | 2236_2263>GAAGCAT | E746_A755>E        | Nenalezeno              |
|      | 2237_2251>AAC     | E746_751T>E        | Nenalezeno              |

### Vzorky z klinického hodnocení AURA2

Test **cobas** EGFR ukázal výsledek „Mutation Detected“ pro následující mutaci genu EGFR pozorovanou na vzorcích z klinického hodnocení AURA2 (Tab. 10). Analytické funkční parametry testu **cobas** EGFR při detekci této mutace nebyly hodnoceny.

Tab. 10 Mutace detekované v kohortě AURA2, u nichž byla zjištěna zkřížená reakce s testem **cobas** EGFR

| Exon | Sekvence mutace | Změna aminokyselin | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|------|-----------------|--------------------|-------------------------|
| 21   | 2572_2573CT>AG  | L858R              | 13553                   |

## Specifita – mikroorganismy a homology genu EGFR

Specifita testu **cobas** EGFR byla testována pomocí plicních mikroorganismů a plazmidů homologů genu EGFR, tj. plazmidů obsahujících sekvenční oblasti HER2, HER3 a HER4, které jsou analogické k sekvencím genu EGFR v exonech 18, 19, 20 a 21 amplifikovaných testem **cobas** EGFR.

### Plicní mikroorganismy

Bylo zjištěno, že *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* při  $4 \times 10^5$  jednotkách tvořících kolonie nereagují zkříženě, ani neovlivňují test **cobas** EGFR po přidání do vzorků obsahujících sekvenční oblasti EGFR a sekvenční oblasti divokého typu během lyze tkáně.

### Plazmidy homologů genu EGFR

Ukázalo se, že strukturálně podobné analogové sekvenční oblasti receptoru epidermálního tyrozinkinázového proteinu (EGFR/HER1, HER2, HER3 a HER4) zkříženě nereagovaly s testem **cobas** EGFR, když byla před amplifikací a detekcí přidána potenciálně zkříženě reagující sekvenční oblasti v počtu kopií genomicky ekvivalentním 50 ng/PCR do zásobní izolované DNA. Byla vložena kontrolní podmínka bez plazmidu DNA. Výsledky ukázaly, že pozorované mutace všech 15 testovaných vzorků FFPET odpovídaly očekávaným mutacím stanoveným sekvenováním, jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti přidané plazmidové DNA genu HER. Dále byla mutace L747S v exonu 19 genu EGFR testována na zkříženou reaktivitu. Výsledky ukázaly, že test **cobas** EGFR zkříženě reaguje s mutací L747S genu EGFR v exonu 19.

## Interference

Ukázalo se, že triglyceridy (37 mM, vysoká koncentrace doporučená CLSI<sup>21</sup>) a hemoglobin (2 mg/ml, vysoká koncentrace doporučená CLSI<sup>21</sup>) neinterferují s testem **cobas** EGFR, když je potenciálně interferující látka přidána do lýzy během přípravy vzorku.

Ukázalo se, že Albuterol (Ventolin), Ipratropium (Atrovent), Fluticasone (Flonase), Ceftazidime (Fortaz), Imipenem-cilastin (Primaxin), Piperacillin-tazobactam, Cilastin (Cilastatin sodium), Betadine a Lidocaine neinterferují s účinností testu **cobas** EGFR, když jsou přidány do lýzy během přípravy vzorku.

## Nekrotická tkáň

Ukázalo se, že vzorky NSCLC FFPET s obsahem nekrotické tkáně do 60 % u mutací genu EGFR a do 85 % u vzorků divokého typu neinterferují s výsledky testu **cobas** EGFR.

## Opakovatelnost

Opakovatelnost testu **cobas** EGFR byla vyhodnocena pomocí šesti vzorků FFPET, které zahrnovaly: dva EGFR vzorky divokého typu; čtyři vzorky s mutací genu EGFR, po jednom z každého typu: delece v exonu 19, mutace S768I a G719X, T790M a L858R a inzerční mutace v exonu 20. Tyto vzorky byly testovány v duplikátu dvěma obsluhami, pomocí dvou různých šarží činidel a na dvou analyzátořích **cobas**® z 480 v průběhu čtyř dní. Z každého vzorku bylo vyhodnoceno 32 replikátů. Test **cobas** EGFR měl míru správnosti 96,9 % (186/192).

Opakovatelnost testu **cobas** EGFR byla rovněž vyhodnocena pomocí druhé studie se čtyřmi vzorky FFPET: jeden vzorek EGFR divokého typu, tři FFPET vzorky s mutací genu EGFR, po jednom z každého typu: Inzerční mutace v L861Q, G719X a v exonu 20. Tyto vzorky byly testovány v duplikátu dvěma obsluhami, pomocí dvou různých šarží činidel a na dvou analyzátořích **cobas**® z 480 v průběhu několika dní. Test **cobas** EGFR má míru správnosti 99,2 % (127/128) při všech kombinacích replikátů vzorků, obsluhy, šarží činidel a přístrojů.

## Reprodukovatelnost zacházení se vzorky

Reprodukovatelnost soupravy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit byla testována pomocí řezů ze tří bloků vzorků FFPET. Jeden obsahoval deleci v exonu 19, jeden obsahoval mutaci L858R a jeden byl divokého typu. Každý vzorek byl v duplikátu testován na každém pracovišti každý den. Řezy daného vzorku byly randomizovány a testovány v šesti dnech na třech pracovištích. Na každém pracovišti byla jedna obsluha a jeden analyzátor **cobas**® z 480, tři šarže soupravy **cobas**® DNA Sample Preparation Kit a jedna šarže soupravy testu **cobas** EGFR. V každém testovacím dni každý člen obsluhy izoloval a testoval DNA ze dvou řezů NSCLC FFPET každého vzorku pomocí testu **cobas** EGFR. Po všech šest dní testování vykazovaly všechny vzorky platné a správné výsledky. Při všech kombinacích vzorků a obsluhy měl test **cobas** EGFR míru správnosti 100 % (108/108).

# Hodnocení klinických výsledků

## Klinická studie reprodukovatelnosti 1

Reprodukovatelnost testu **cobas** EGFR byla stanovena pomocí externí studie na 3 externích testovacích pracovištích (2 pracovníci na každém pracovišti), 3 šarží činidel a v 5 testovacích dnech nejdoucích po sobě. Použit byl 13členný panel vzorků DNA z FFPE řezů vzorků nádoru NSCLC divokého typu (WT) a typu mutace (MT). Tento panel zahrnoval mutace L858R v exonu 21 a pět různých delecí v exonu 19. Z 92 cyklů bylo 90 (97,8 %) platných. Celkem bylo provedeno 2340 testů u 13 členů panelu v 90 platných cyklech; všechny výsledky testů byly platné. Mezi 180 platnými testy členů panelu WT nebyly žádné výsledky „Mutation Detected“, čímž došlo ke 100% shodě. Shody byly 100% pro 10 z 12 členů panelu MT. Pro člena panelu EX19\_2240\_2257del18 – 5% mutace, shoda 62,8 % (67 ze 180 výsledků testů mělo status „No Mutation Detected“). Pro člena panelu EX19\_2240\_2257del18 – 10% mutace, shoda 99,4 % (1 ze 180 výsledků testů měl status „No Mutation Detected“). Výsledky dle celkové shody uvádí Tab. 11. Variační koeficient (CV) byl < 6 % u všech členů panelu mutace. V rámci každého člena panelu byl variační koeficient < 3,5 %. Pro externí kontrolu byl celkový variační koeficient < 1,3 %. CV mezi šaržemi byl < 0,5 % a < 1,2 % v rámci šarže.

**Tab. 11 Odhad celkové shody podle člena panelu ve studii reprodukovatelnosti testu cobas EGFR 1**

| Položka panelu                     | Počet platných testů | Shoda (N) | Shoda % (95% CI) <sup>a</sup> |
|------------------------------------|----------------------|-----------|-------------------------------|
| Divoký typ                         | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2235_2249del15 – 5% mutace    | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2235_2249del15 – ≤ 10% mutace | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2236_2250del15 – 5% mutace    | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2236_2250del15 – ≤ 10% mutace | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2239_2248>C – 5% mutace       | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2239_2248>C – ≤ 10% mutace    | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2240_2254del15 – 5% mutace    | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2240_2254del15 – ≤ 10% mutace | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX19_2240_2257del18 – 5% mutace    | 180                  | 113       | 62,8 (55,3, 69,9)*            |
| EX19_2240_2257del18 – ≤ 10% mutace | 180                  | 179       | 99,4 (96,9, 100,0)*           |
| EX21_2573T>G=L858R – 5% mutace     | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |
| EX21_2573T>G=L858R – ≤ 10% mutace  | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0)             |

Pozn.: výsledky se shodovaly, když člen panelu MT měl platný výsledek „Mutation Detected“ nebo když člen panelu divokého typu měl platný výsledek „No Mutation Detected“.

<sup>a</sup> 95% CI = exaktní 95% binomický interval spolehlivosti.

\* Při detekci této mutace je analytická citlivost testu **cobas** EGFR vyšší než cílová 10% hladina mutace při použití standardní koncentrace 50 ng na reakční jamku.

## Klinická studie reprodukovatelnosti 2

Reprodukovatelnost testu **cobas** EGFR byla stanovena pomocí externí studie na 3 testovacích pracovištích (2 externí a 1 interní, 2 pracovníci na každém pracovišti), 3 šarží činidel a v 5 testovacích dnech nejdoucích po sobě. Použit byl 11členný panel vzorků DNA extrahované z FFPEt řezů vzorků nádoru NSCLC divokého typu (WT) a mutantních vzorků nádorů (MT). Tento panel zahrnoval mutaci G719X v exonu 18, mutaci T790M v exonu 20, mutaci S768I v exonu 20, inzerční mutaci v exonu 20 a mutaci L861Q v exonu 21. Z 91 cyklů bylo 90 (98,9 %) platných. Celkem bylo provedeno 1980 duplikovaných testů u 11 členů panelu v 90 platných cyklech; všechny výsledky testů byly platné. Mezi 180 platnými testy členů panelu WT nebyly žádné výsledky „Mutation Detected“, čímž došlo ke 100% shodě. U všech členů panelu s mutací, kromě vzorků LoD pro inzerce v exonu 20, byly shody 100%. Výsledky dle celkové shody uvádí Tab. 12 níže. Variační koeficient (CV) byl < 9,2 % u všech členů panelu s mutací. Pro externí kontrolu byl celkový variační koeficient ≤ 1,3 %. Mezi šaržemi byl CV ≤ 0,6 % a v rámci šarže ≤ 1,1 %.

**Tab. 12 Odhad celkové shody podle člena panelu ve studii reprodukovatelnosti testu cobas EGFR 2**

| Položka panelu               | Počet platných testů | Shoda (N) | Shoda % (95% CI)* |
|------------------------------|----------------------|-----------|-------------------|
| Divoký typ                   | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Exon 18 G719X – LoD          | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Exon 20 T790M – LoD          | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Exon 20 S768I – LoD          | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Inzerce v exonu 20 – LoD     | 180                  | 166       | 92,2 (87,3, 95,7) |
| Exon 21 L861Q – LoD          | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Exon 18 G719X – 2 × LoD      | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Exon 20 T790M – 2 × LoD      | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Exon 20 S768I – 2 × LoD      | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Inzerce v exonu 20 – 2 × LoD | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |
| Exon 21 L861Q – 2 × LoD      | 180                  | 180       | 100 (98,0, 100,0) |

Pozn.: výsledky se shodovaly, když člen panelu s typem mutace měl platný výsledek „Mutation Detected“ pro cílovou mutaci nebo když člen panelu divokého typu měl platný výsledek „NMD“.

\* 95% CI = exaktní 95% binomický interval spolehlivosti.

CI = interval spolehlivosti; LoD = mez detekce; NMD = „No Mutation Detected“

## Korelace s referenční metodou s použitím vzorků fáze III z klinického hodnocení EURTAC

Klinické výsledky testu **cobas** EGFR byly vyhodnoceny srovnáním se dvěma referenčními metodami – 2× dvousměrnou Sangerovou sekvenční metodou a kvantitativním sekvenováním nové generace (NGS) – s použitím 487 vzorků karcinomu plic fixovaných ve formalinu a zalitých v parafrinových blocích od pacientů s pokročilým NSCLC, kteří se podrobili screeningu ve fázi III klinického hodnocení EURTAC přípravku TARCEVA® (erlotinib) oproti chemoterapii založené na cisplatině.<sup>6, 22</sup> Klinické a demografické charakteristiky pacientů, jejichž vzorky byly k dispozici pro toto retrospektivní testování, byly srovnatelné s jinak způsobilými pacienty (557), jejichž vzorky nebyly pro opakované testování k dispozici.

V hodnocení EURTAC prošlo screeningem celkem 1276 pacientů, kteří byli testováni laboratorně vyvinutými testy souborně nazývanými klinické hodnocení (CTA). Po vyřazení nezpůsobilých pacientů a pacientů bez výsledků CTA bylo pro tuto studii potenciálně způsobilých 1044 pacientů. Mezi 1044 způsobilými pacienty bylo 225 pacientů, jejichž vzorky byly pozitivní na mutaci podle CTA, 792 pacientů mělo vzorky s mutací divokého typu podle CTA a 27 vzorků bylo podle CTA neprůkazných. Z 1044 potenciálně způsobilých pacientů bylo k dispozici pro opakované testování pomocí testu **cobas** EGFR 487 vzorků.

Všech 487 vzorků bylo testováno zaslepeným způsobem pomocí testu **cobas** EGFR a Sangerovou sekvenční metodou. Z tohoto počtu mělo 406 vzorků platné výsledky jak u testu **cobas** EGFR, tak i u testu Sangerovou sekvenční metodou, 38 vzorků mělo neplatné výsledky jak u testu **cobas** EGFR, tak i u testu Sangerovou sekvenční metodou, 38 vzorků mělo neplatné výsledky testů jen u Sangerovy sekvenční metody a 5 neplatných výsledků bylo jen u testu **cobas** EGFR. Z 487 vzorků k dispozici pro opakované testování **cobas** EGFR mělo 444 vzorků platné výsledky testu **cobas** EGFR a byly rovněž testovány NGS. Z nich mělo 36 neplatné výsledky u NGS; takže 408 vzorků mělo platné výsledky jak u testu **cobas** EGFR, tak i u NGS. Analytická přesnost testu **cobas** EGFR srovnaná s každou referenční metodou byla vyhodnocena stanovením procentní shody u pozitivních vzorků (PPA), procentní shody u negativních vzorků (NPA) a celkové procentní shody (OPA) a jejich odpovídající 95% CI pro delece v exonu 19 a mutace L858R jak celkově, tak i zvlášť.

V kohortě EURTAC test **cobas** EGFR detekoval mutace v exonu 19 a exonu 21 genu EGFR (viz Tab. 13). Na základě mutací detekovaných v kohortě EURTAC byla analytická senzitivita prokázána na mutacích (viz Tab. 6).

Tab. 13 Mutace detekované testem **cobas** EGFR v kohortě EURTAC

| Exon | Sekvence mutace         | Změna aminokyselin | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|------|-------------------------|--------------------|-------------------------|
| 19   | 2235_2249del15          | E746_A750delELREA  | 6223                    |
|      | 2236_2250del15          | E746_A750delELREA  | 6225                    |
|      | 2239_2256del18          | L747_S752delLREATS | 6255                    |
|      | 2240_2257del18          | L747_P753>S        | 12370                   |
|      | 2239_2248 TTAAGAGAAG >C | L747_A750>P        | 12382                   |
|      | 2239_2251>C             | L747_T751>P        | 12383                   |
|      | 2237_2255>T             | E746_S752>V        | 12384                   |
|      | 2237_2253>TTGCT         | E746_T751>VA       | 12416                   |
|      | 2237_2257>TCT           | E746_P753>VS       | 18427                   |
|      | 2238_2252del15          | L747_T751delLREAT  | 23571                   |
|      | 2236_2252>AT            | E746_T751>I        | 26680                   |
|      | 2239_2253>CAA           | L747_T751>Q        | 51527                   |
|      | 2234_2251>AAT           | K745_T751>K        | Nenalezeno              |
|      | 2236_2244del9           | E746_R748>E        | Nenalezeno              |
|      | 2236_2263>GAAGCAT       | E746_A755>E        | Nenalezeno              |
|      | 2237_2251>AAC           | E746_751T>E        | Nenalezeno              |
|      | 2239_2257>GT            | L747_P753>V        | Nenalezeno              |
| 21   | 2573 T>G                | L858R              | 6224                    |

Do analýzy shody bylo zařazeno celkem 406 vzorků s platnými výsledky testu **cobas** EGFR a Sangerova testu. Celkově v detekci delecí v exonu 19 a mutací L858R byla PPA mezi testem **cobas** EGFR a Sangerovou sekvenační metodou 96,6 % (95% CI: 91,5 %, 98,7 %) a NPA byla 88,3 % (95% CI: 84,1 %, 91,5 %), jak uvádí Tab. 14. Celková procentní shoda (OPA) byla 90,6 % se spodní mezí 95% CI nad 87 %. Parametry PPA, NPA a OPA pro detekci delecí v exonu 19 byly všechny > 92 %. Parametry PPA, NPA a OPA pro detekci porovnávaných mutací L858R byly všechny > 95 %.

**Tab. 14 Srovnání testu cobas EGFR se Sangerovou sekvenační metodou při detekci delecí v exonu 19 a mutace L858R genu EGFR**

| Mutace         | Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|----------------|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Exon 19 delecí | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 97,3 % (71/73)      | 90,5 %, 99,2 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 92,5 % (308/333)    | 89,2 %, 94,9 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 93,3 % (379/406)    | 90,5 %, 95,4 % |
| L858R          | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 95,3 % (41/43)      | 84,5 %, 98,7 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 97,5 % (354/363)    | 95,4 %, 98,7 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 97,3 % (395/406)    | 95,2 %, 98,5 % |
| Celkově        | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 96,6 % (112/116)    | 91,5 %, 98,7 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 88,3 % (256/290)    | 84,1 %, 91,5 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 90,6 % (368/406)    | 87,4 %, 93,1 % |

Do analýzy shody bylo zařazeno celkem 408 vzorků s platnými výsledky testu **cobas** EGFR a testu NGS. Výsledek srovnání PPA a NPA mezi testem **cobas** EGFR a NGS detekce delecí v exonu 19 a bodové mutace L858R byl celkově 94,0 % (95% CI: 89,1 %, 96,8 %) a 97,7 % (95% CI: 95,0 %, 98,9 %), jak uvádí Tab. 15. OPA byla 96,3 % se spodní mezí 95% CI 94,0 %. Při detekci delecí v exonu 19 byly parametry PPA, NPA a OPA všechny > 95 %, se všemi dolními mezemi 95% CI > 90 %. Hodnoty PPA, NPA a OPA byly v detekci mutace L858R rovněž všechny > 95 % a dolní meze 95% CI ≥ 95 %, kromě PPA (90 %) a to kvůli nízkému počtu detekovaných mutací L858R.

**Tab. 15 Srovnání testu cobas EGFR s testem NGS při detekci delecí v exonu 19 a mutace L858R genu EGFR**

| Mutace         | Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|----------------|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Exon 19 delecí | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 95,9 % (94/98)      | 90,0 %, 98,4 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 99,7 % (309/310)    | 98,2 %, 99,9 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 98,8 % (403/408)    | 97,2 %, 99,5 % |
| L858R          | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 90,6 % (48/53)      | 79,7 %, 95,9 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 98,6 % (350/355)    | 96,7 %, 99,4 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 97,5 % (398/408)    | 95,5 %, 98,7 % |
| Celkově        | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 94,0 % (142/151)    | 89,1 %, 96,8 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 97,7 % (251/257)    | 95,0 %, 98,9 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 96,3 % (393/408)    | 94,0 %, 97,8 % |

## Korelace s referenční metodou s použitím vzorků fáze II z klinického hodnocení AURA2

Klinické výsledky testu **cobas** EGFR byly vyhodnoceny porovnáním s validovanou platformou sekvenování nové generace (NGS) s použitím 383 vzorků karcinomu plic fixovaných formalínem a zalitých v parafinu od pacientů s pokročilým NSCLC, kteří se podrobili screeningu pomocí testu **cobas** EGFR ve fázi II klinického hodnocení AURA2 zkoumajícího přípravek TAGRISSO® (osimertinib).

Během klinického hodnocení AURA2 prošlo screeningem s použitím testu **cobas** EGFR celkem 472 pacientů. Po vyřazení nezpůsobilých pacientů bylo pro účast v této studii způsobilých 383 pacientů.

Všech 383 vzorků bylo testováno zaslepeným způsobem pomocí testu **cobas** EGFR i validovanou metodou NGS. Z nich mělo 368 platné výsledky jak u testu **cobas** EGFR, tak i u NGS. Celkem 2 neplatné výsledky byly pozorovány u testu **cobas** EGFR i NGS, 2 neplatné výsledky pouze u NGS a 11 neplatných výsledků pouze u testu **cobas** EGFR. Analytická přesnost testu **cobas** EGFR srovnaná s referenční metodou NGS pro detekci mutace T790M, byla vyhodnocena pomocí odhadu procenta shody pozitivních vzorků (PPA), procenta shody negativních vzorků (NPA) a celkového procenta shody (OPA) a jejich odpovídajícího 95% CI pro mutaci T790M.

V klinickém hodnocení AURA2 test **cobas** EGFR detekoval mutace genu EGFR (viz Tab. 16). Na základě mutací detekovaných v klinickém hodnocení AURA2 byla analytická senzitivita prokázána na mutacích (viz Tab. 6).

**Tab. 16 Mutace detekované testem cobas EGFR v kohortě AURA2**

| Exon | Sekvence mutace        | Změna aminokyselin   | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| 18   | 2156G>C                | G719A                | 6239                    |
|      | 2155G>A                | G719S                | 6252                    |
|      | 2155G>T                | G719C                | 6253                    |
| 19   | 2239_2247delTTAAGAGAA  | L747_E749delLRE      | 6218                    |
|      | 2235_2249del15         | E746_A750delELREA    | 6223                    |
|      | 2236_2250del15         | E746_A750delELREA    | 6225                    |
|      | 2239_2256del18         | L747_S752delLREATS   | 6255                    |
|      | 2240_2254del15         | L747_T751delLREAT    | 12369                   |
|      | 2240_2257del18         | L747_P753>S          | 12370                   |
|      | 2239_2248 TTAAGAGAAG>C | L747_A750>P          | 12382                   |
|      | 2239_2251>C            | L747_T751>P          | 12383                   |
|      | 2237_2255>T            | E746_S752>V          | 12384                   |
|      | 2237_2251del15         | E746_T751>A          | 12678                   |
|      | 2235_2248>AATTC        | E746_A750>IP         | 13550                   |
|      | 2235_2252>AAT          | E746_T751>I          | 13551                   |
|      | 2253_2276del24         | S752_I759delSPKANKEI | 13556                   |
|      | 2237_2257>TCT          | E746_P753>VS         | 18427                   |
| 20   | 2369C>T                | T790M                | 6240                    |
|      | 2303G>T                | S768I                | 6241                    |
| 21   | 2573T>G                | L858R                | 6224                    |
|      | 2573_2574TG>GT         | L858R                | 12429                   |
|      | 2582T>A                | L861Q                | 6213                    |

Do analýzy shody bylo zařazeno celkem 368 vzorků s platnými výsledky testu **cobas** EGFR a testu NGS. Parametr PPA mezi testem **cobas** EGFR a NGS byl 88,3 % (95% CI: 83,8 % až 91,7 %), NPA byl 97,3 % (95% CI: 92,4 % až 99,1 %) a OPA byl 91,0 % (95% CI: 87,7 % až 93,5 %) při detekci mutace T790M – viz Tab. 17. Třicet vzorků bylo podle NGS pozitivních, avšak negativních dle testu **cobas** EGFR: u 10/30 vzorků bylo procento mutace T790M stanovené pomocí NGS nižší než LoD (< 2 % mutace) testu **cobas** EGFR. U 20/30 vzorků středně zpožděná hodnota IC Ct znamenala špatnou amplifikovatelnost templátu DNA.

Tab. 17 Srovnání testu cobas EGFR s NGS při detekci mutace T790M genu EGFR

| Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 88,3 % (226/256)    | 83,8 %, 91,7 % |
| Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 97,3 % (109/112)    | 92,4 %, 99,1 % |
| Celková procentní shoda (OPA)            | 91,0 % (335/368)    | 87,7 %, 93,5 % |

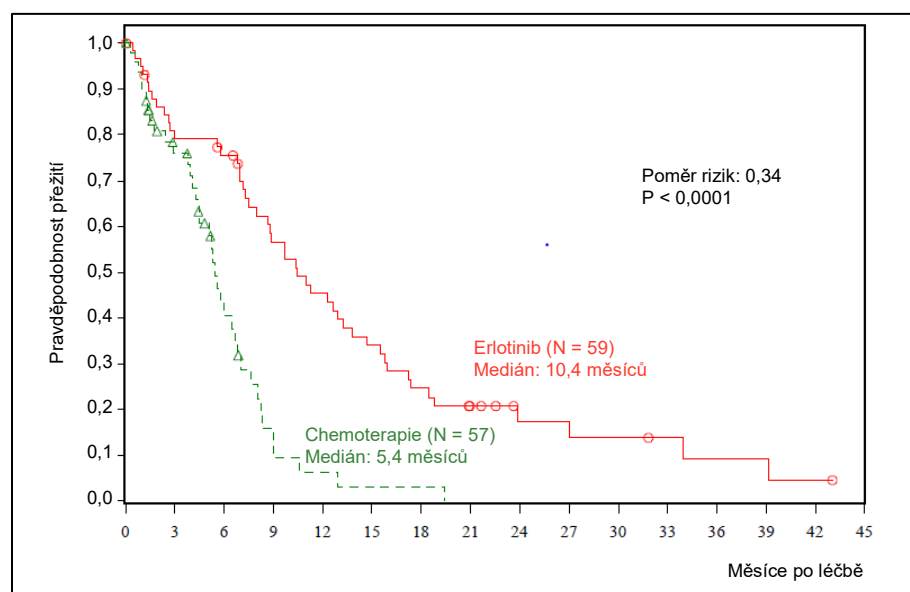
## Výsledné klinické údaje

### EURTAC

Studie EURTAC<sup>22</sup> byla multicentrická, otevřená, randomizovaná studie fáze III srovnávající přípravek TARCEVA® (erlotinib) se standardní chemoterapií na bázi platiny jako první linie terapie u pacientů s pokročilým NSCLC, kteří dosud nepodstoupili chemoterapii a jejichž nádory mají delece v exonu 19 nebo substituční mutace v exonu 21 (L858R) genu EGFR podle výsledků klinického hodnocení (CTA). Studii sponzorovala organizace Spanish Lung Cancer Group (SLCG). Do studie bylo zapojeno celkem 174 pacientů. Výsledky hodnocení ukázaly, že pacienti užívající hodnocený přípravek TARCEVA®, měli statisticky významný nárůst doby přežití do progresu (PFS) (medián PFS 10,4 měsíce proti 5,1 měsíce) ve srovnání s pacienty léčenými chemoterapií; poměr rizik 0,34 ( $p < 0,0001$ , 95% CI [0,23; 0,49]). Procento odpovědi na léčbu pacientů v rameni s přípravkem TARCEVA® bylo vyšší než procento odpovědi na léčbu pacientů léčených chemoterapií (65,1 % proti 16,1 %). V celkové době přežití (OS) nebyl mezi těmito dvěma rameny zjištěn žádný významný rozdíl, protože 76 % pacientů v rameni se standardní chemoterapií přešlo k užívání přípravku TARCEVA®.

Ze 174 pacientů účastnících se klinického hodnocení EURTAC, 134 pacientů (77 % populace studie, včetně 69 pacientů z ramena s TARCEVA® a 65 pacientů z ramena s chemoterapií) bylo k dispozici pro opakované testování a bylo testováno retrospektivně pomocí testu **cobas** EGFR. U 134 opět testovaných případů testem **cobas** EGFR, 116 případů (59 pacientů z ramena s TARCEVA® a 57 pacientů z ramena s chemoterapií) mělo v testu **cobas** EGFR výsledek „Mutation Detected“. Analýza této 116členné podskupiny ukázala, že u pacientů léčených přípravkem TARCEVA® došlo k podstatnému prodloužení doby přežití do progresu (medián PFS byl 10,4 proti 5,4 měsíce) a menší pravděpodobnost vývoje progresivní choroby nebo smrti (poměr rizik = 0,34, 95% CI [0,21; 0,54],  $p < 0,0001$ ) než u pacientů léčených chemoterapií (Obrázek 3). Procento odpovědi bylo v rameni s přípravkem TARCEVA® vyšší ve srovnání s ramenem s chemoterapií (59,3 % proti 14,0 %). Mezi těmito dvěma skupinami nebyl pozorován žádný významný rozdíl v délce celkové doby přežití. Pozorovaný klinický přínos v podskupině pacientů vyšetřovaných testem **cobas** EGFR byl srovnatelný s přínosem pozorovaným v celé populaci pacientů studie (Tab. 18).

Byla provedena další analýza účinnosti u pacientů, kteří měli pozitivní výsledek testu **cobas** EGFR, ale negativní nebo neplatný při testu CTA. V případě nejhoršího scénáře (při předpokladu poměru rizik 1 pro pacienty pozitivní dle testu **cobas** EGFR a negativní dle testu CTA), údaje prokázaly poměr rizik 0,42 (95% CI [0,26; 0,57]).

**Obrázek 3** Kaplanův-Meierův graf doby přežití bez progresce podle léčby pro pacienty s mutací detekovanou testem cobas EGFR (vyhodnocení zkoušejícího)**Tab. 18** Klinický přínos pro pacienty s testem cobas EGFR je srovnatelný s přínosem pozorovaným u populace studie EURTAC

| Parametr                  | Populace pozitivní v testu cobas EGFR<br>n = 116 |                     | EURTAC<br>n = 173*     |                     |
|---------------------------|--------------------------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
|                           | Chemoterapie<br>n = 57                           | Erlotinib<br>n = 59 | Chemoterapie<br>n = 87 | Erlotinib<br>n = 86 |
| <b>PFS</b>                |                                                  |                     |                        |                     |
| Medián (měsíce)           | 5,4                                              | 10,4                | 5,1                    | 10,4                |
| Poměr rizik               | 0,34                                             |                     | 0,34                   |                     |
| Poměr rizik 95% CI        | [0,21; 0,54]                                     |                     | [0,23; 0,49]           |                     |
| Hodnota P (log-rank test) | < 0,0001                                         |                     | < 0,0001               |                     |

\* Jeden pacient po skončení studie EURTAC zrušil souhlas, takže počet v souboru dat n = 173.

## AURA2

Studie AURA2<sup>23</sup> byla multicentrická, otevřená studie s jedním ramenem fáze II k hodnocení bezpečnosti a účinnosti přípravku TAGRISSO® (osimertinib) jako léčby druhé nebo ≥ třetí linie u pacientů s pokročilým NSCLC, u nichž došlo k progresi po předchozí terapii schváleným přípravkem EGFR TKI. Všichni pacienti museli mít NSCLC pozitivní na mutaci T790M na základě detekce pomocí testu **cobas** EGFR. Primárním cílovým parametrem účinnosti byla objektivní míra odpovědi (ORR) dle kritérií RECIST 1.1 na základě zaslepeného nezávislého centrálního vyhodnocení (BICR) s použitím souboru hodnotitelných výsledků k analýze odpovědi. Parametr ORR byl definován jako počet (%) pacientů s alespoň 1 návštěvou a výsledkem úplná odpověď (CR) nebo částečná odpověď (PR), která byla potvrzena nejméně 4 týdny poté (tj. nejlepší objektivní odpověď [BOR] CR nebo PR).

Ze 472 pacientů, kteří podstoupili screening pro studii AURA2, bylo 383 pacientů způsobilých k testování pomocí testu **cobas** EGFR. Z těchto způsobilých bylo 233 pacientů pozitivních na mutaci T790M přijato do studie AURA2 a 210 pacientů bylo zařazeno a obdrželo přípravek TAGRISSO® (úplný soubor k analýze [FAS]).

Tab. 19 níže uvádí ORR podle BICR a hodnocení zkoušejícího ve studii AURA2. Z 210 pacientů, kteří dostali alespoň jednu dávku přípravku TAGRISSO® (FAS), byla u 128 potvrzena odpověď dle BICR s ORR 61,0 % (95% CI: 54,0 % až 67,6 %) a 135 na základě hodnocení zkoušejícího s ORR 64,3 % (95% CI: 57,4 % až 70,8 %).

Všech 383 pacientů způsobilých k účasti ve studii AURA2 bylo opakovaně testováno pomocí testu **cobas** EGFR. Z 233 pacientů pozitivních na mutaci T790M zařazených do studie AURA2 bylo 225 identifikováno jako T790M-pozitivní pomocí testu **cobas** EGFR a 204 bylo v souboru FAS.

Z 204 pacientů, kteří dostali přípravek TAGRISSO® (FAS), byla u 127 potvrzena odpověď dle BICR s ORR 62,3 % (95% CI: 55,2 % až 68,9 %) a 133 na základě hodnocení zkoušejícího s ORR 65,2 % (95% CI: 58,2 % až 71,7 %).

**Tab. 19 Klinický přínos pro T790M-pozitivní pacienty testované pomocí testu cobas EGFR ve studii AURA2**

|                              |                                         | AURA2 |                            |                            | Test cobas EGFR (IVD)<br>T790M-pozitivní |                            |                            |
|------------------------------|-----------------------------------------|-------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Soubor k analýze             | Hodnotil                                | N     | Počet potvrzených odpovědí | ORR (95% CI)               | N                                        | Počet potvrzených odpovědí | ORR (95% CI)               |
| Úplný soubor k analýze (FAS) | Zaslepené nezávislé centrální hodnocení | 210   | 128                        | 61,0 %<br>(54,0 %, 67,6 %) | 204                                      | 127                        | 62,3 %<br>(55,2 %, 68,9 %) |
|                              | Zkoušející                              |       | 135                        | 64,3 %<br>(57,4 %, 70,8 %) |                                          | 133                        | 65,2 %<br>(58,2 %, 71,7 %) |

## FLAURA

### I. Klinické hodnocení fáze III pro první linii léčby přípravkem TAGRISSO®

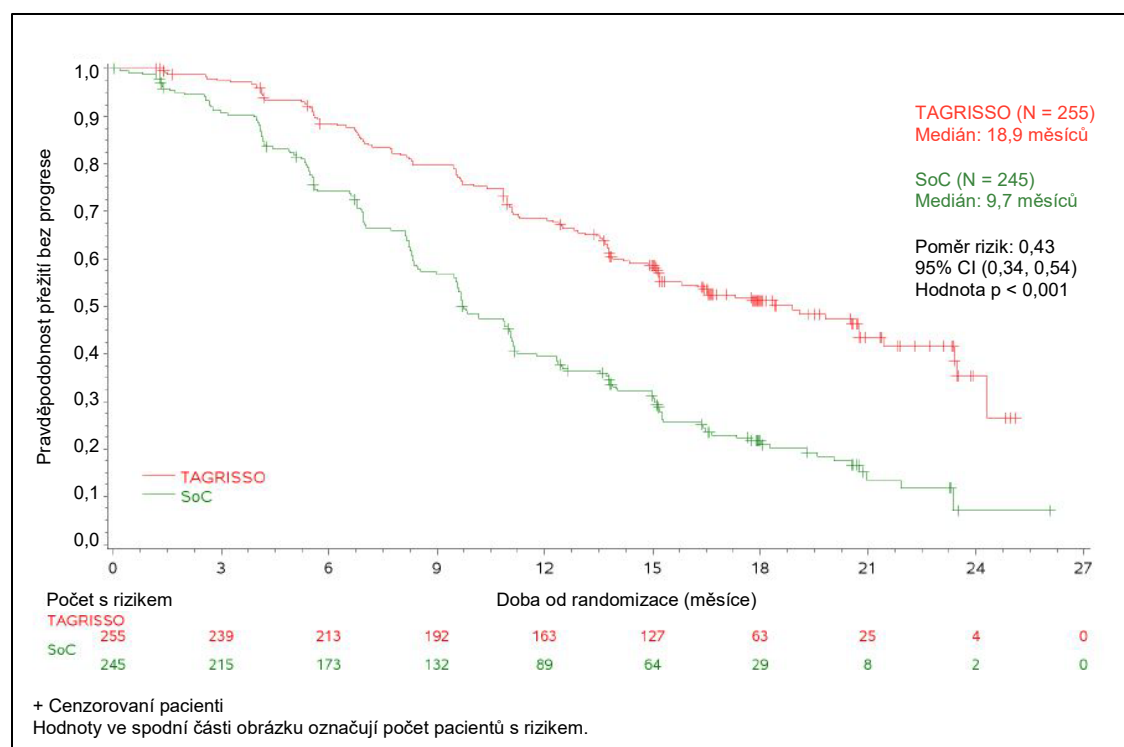
Klinické hodnocení FLAURA<sup>10</sup> bylo dvojité zaslepené, randomizované klinické hodnocení fáze III k vyhodnocení účinnosti a bezpečnosti přípravku TAGRISSO® oproti standardní léčbě (SoC: s použitím EGFR-TKI [gefitinib nebo erlotinib]) jako léčby první linie u pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým NSCLC, kteří nepodstoupili předchozí systémovou léčbu pokročilého onemocnění a u jejichž nádorů byly místně nebo centrálně potvrzeny senzitivizující mutace EGFR, Ex19Del nebo substituční mutace L858R, souhrnně uváděné jako EGFRm pozitivní. Primárním cílovým parametrem studie FLAURA bylo přežití bez progresu (PFS) na základě vyhodnocení zkoušejícím u pacientů v plném souboru k analýze (FAS: všichni randomizovaní pacienti na celém světě).

Celkem 994 pacientů absolvovalo screening pro randomizaci v klinickém hodnocení, z nichž u 809 pacientů byly vzorky nádorové tkáně testovány centrální laboratorní testem **cobas** EGFR buď prospektivně při screeningu nebo retrospektivně. Z 556 randomizovaných pacientů (289 randomizováno na základě centrálního testu tkáně **cobas** a 267 randomizováno na základě místního testu) bylo u 500 pacientů potvrzeno, že mají pozitivní výsledek centrálně provedeného testu **cobas** EGFRm. Z 267 pacientů randomizovaných na základě místního testu byl u 211 pacientů potvrzen pozitivní výsledek centrálního testu **cobas** EGFRm, 41 pacientů nemělo výsledek testu **cobas** v důsledku chybějícího nebo nedostatečného vzorku, 9 pacientů mělo neplatný výsledek testu **cobas** a 6 pacientů mělo výsledek testu **cobas** „No Mutation Detected“.

Tab. 20 níže uvádí HR pro PFS podle vyhodnocení zkoušejícího u úplného souboru k analýze a populace primárního zařízení (pacienti s pozitivním výsledkem centrálního testu tkáně **cobas** EGFRm). HR pro PFS podle hodnocení zkoušejícího pro úplný soubor k analýze (N = 556), na základě stratifikovaného log rank testu, byl 0,46 (95% CI: 0,37, 0,57). Stejný bodový odhad byl získán z neupraveného Coxova modelu proporcionálních rizik. HR pro PFS podle hodnocení zkoušejícího pro populaci primárního zařízení (N = 500), vypočítaný z neupraveného Coxova modelu proporcionálních rizik, byl 0,43 (95% CI: 0,34, 0,54). Klinická účinnost pozorovaná u populace primárního zařízení byla konzistentní s úplným souborem k analýze. Kaplan-Meierovu křivku PFS dle hodnocení zkoušejícího u populace primárního zařízení uvádí Obrázek 4.

**Tab. 20** Přežití bez progresse podle hodnocení zkoušejícího pro úplný soubor k analýze FLAURA a pro populaci primárního zařízení (pozitivní výsledek testu cobas EGFR)

|                                    | Úplný soubor k analýze FLAURA<br>N = 556 |                                       | Populace FLAURA s pozitivními výsledky testu<br>cobas EGFR (populace primárního zařízení)<br>N = 500 |                                       |
|------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
|                                    | Osimertinib<br>(N = 279)                 | Gefitinib nebo erlotinib<br>(N = 277) | Osimertinib<br>(N = 255)                                                                             | Gefitinib nebo erlotinib<br>(N = 245) |
| <b>PFS</b>                         |                                          |                                       |                                                                                                      |                                       |
| Počet příhod (%)                   | 136 (49)                                 | 206 (74)                              | 124 (49)                                                                                             | 188 (77)                              |
| Medián PFS v měsících<br>(95% CI)  | 18,9<br>(15,2, 21,4)                     | 10,2<br>(9,6, 11,1)                   | 18,9<br>(15,2, 21,4)                                                                                 | 9,7<br>(9,5, 11,0)                    |
| Poměr rizik (95% CI) <sup>a</sup>  | 0,46<br>(0,37, 0,57)                     |                                       | 0,43<br>(0,34, 0,54)                                                                                 |                                       |
| Oboustranná p-hodnota <sup>a</sup> | < 0,0001                                 |                                       | < 0,001                                                                                              |                                       |

<sup>a</sup> Neupravený Coxův model proporcionálních rizik**Obrázek 4** Kaplanův-Meierův graf doby přežití bez progresse podle léčby pro pacienty s mutací detekovanou testem cobas EGFR (vyhodnocení zkoušejícího) v klinickém hodnocení FLAURA

## II. Analýza standardní léčby přípravkem IRESSA®

U pacientů tEGFR+ léčených přípravkem IRESSA® (gefitinib) v kontrolním rameni studie FLAURA byla provedena samostatná analýza. Z celkového počtu 178 pacientů léčených přípravkem IRESSA® mělo 174 objektivní odpověď vyhodnocenou zkoušejícím [ORR = 67,8 % (118/174, 95% CI: 60,6%, 74,3%, POP0 v Tab. 21)].

Ze 79 pacientů léčených přípravkem IRESSA® a randomizovaných na základě centrálního testu tkáně **cobas** (primární populace účinnosti), mělo 57 objektivní odpověď s ORR 72,2 % (95% CI: 61,4 %, 80,8 %, POP1 v Tab. 21).

Účinek léčby přípravku IRESSA® na základě testu tkáně **cobas** byl zachován u dalších populací pacientů s ORR v rozsahu od 64,2 % (POP2, zařazení dle místního testu a také pacienti **cobas** tEGFR+) až 68,5 % (POP3, všichni pacienti **cobas** tEGFR+) (Tab. 21 a Obrázek 5). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky hlášenými v původní registrační studii (IFUM) u vybraných pacientů léčených přípravkem IRESSA®.<sup>13</sup>

**Tab. 21 Výsledky ORR pro různé populace pacientů na základě testu tkáně cobas EGFR**

| Objektivní odpověď na léčbu | Randomizovaní pacienti v rameni SoC léčení přípravkem IRESSA® |                                             |              |                                             |                                               |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                             | Randomizovaní centrálně (cobas tEGFR+)                        | Randomizovaní místně (Local tEGFR+)         |              |                                             | Celkem                                        |
|                             |                                                               | cobas tEGFR+                                | cobas tEGFR- | cobas tEGFR Neplatné/ není známo            |                                               |
| Počet pacientů              | 79                                                            | 70                                          | 2            | 23                                          | 174                                           |
| Odpověď                     | 57                                                            | 45                                          | 1            | 15                                          | 118                                           |
| Bez odpovědi                | 22                                                            | 25                                          | 1            | 8                                           | 56                                            |
| ORR (% , 95% CI)            | POP1 = 72,2 %<br>(57/79:<br>61,4 %, 80,8 %)                   | POP4 = 64,3 %<br>(45/70:<br>52,6 %, 74,5 %) | -            | POP5 = 65,2 %<br>(15/23:<br>44,9 %, 81,2 %) | POP0 = 67,8 %<br>(118/174:<br>60,6 %, 74,3 %) |
|                             | -                                                             | POP2 = 64,2 %<br>(61/95: 54,2 %, 73,1 %)    |              |                                             | -                                             |
|                             | POP3 = 68,5 %<br>(102/149: 60,6 %, 75,4 %)                    |                                             | -            | -                                           | -                                             |

Pozn.: pacienti s chybějící objektivní odpovědí byli vyloučeni.

Poznámka: tEGFR = tkáňový EGFR; CI = (skóre) interval spolehlivosti.

POP = populace (podskupina).

POP1: ORR pro pacienty randomizované podle testu tkáně **cobas** (primární populace účinnosti pro test tkáně **cobas**).

POP2: ORR pro pacienty randomizované podle místního testu tkáně.

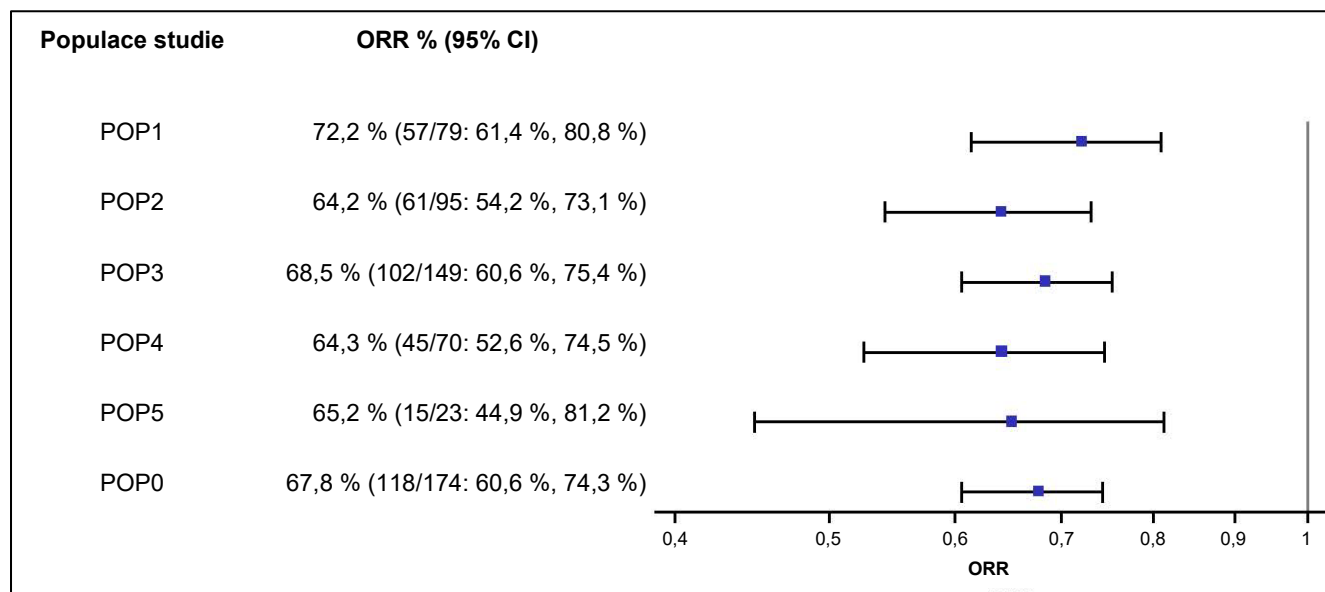
POP3: ORR pro pacienty pozitivní na test tkáně **cobas**.

POP4: ORR pro pacienty randomizované podle místního testu tkáně a potvrzené testem tkáně **cobas**.

POP5: ORR pro pacienty randomizované podle místního testu tkáně s neplatným výsledkem nebo netestované testem tkáně **cobas**.

POP0: ORR pro všechny pacienty léčené přípravkem IRESSA®.

Obrázek 5 Forest grafy ORR podle testu cobas EGFR v tkáni u různých populací



POP = populace (podskupina).

POP1: ORR pro pacienty randomizované podle testu tkáně **cobas** (primární populace účinnosti pro test tkáně **cobas**).

POP2: ORR pro pacienty randomizované podle místního testu tkáně.

POP3: ORR pro pacienty pozitivní na test tkáně **cobas**.

POP4: ORR pro pacienty randomizované podle místního testu tkáně a potvrzené testem tkáně **cobas**.

POP5: ORR pro pacienty randomizované podle místního testu tkáně s neplatným výsledkem nebo netestované testem tkáně **cobas**.

POP0: ORR pro všechny pacienty léčené přípravkem IRESSA®.

## ČÁST B: POUŽITÍ SE VZORKY PLAZMY

### Příprava vzorků

Pro izolaci DNA ze vzorků plazmy viz soupravu **cobas®** cfDNA Sample Preparation Kit (M/N 07247737190).

### Materiály a činidla

#### Materiály a činidla, která jsou součástí dodávky

| Soupravy/Kazety                                                               | Součásti a složky činidel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Množství na test | Bezpečnostní symboly a varování |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------|
| <b>cobas® EGFR<br/>Mutation Test v2 Kit</b><br>24 testů<br>(M/N: 07248563190) | <b>EGFR MMX-1</b><br>(EGFR Master Mix 1)<br>(M/N: 06471366001)<br>Tris pufr<br>Chlorid draselný<br>Glycerol<br>EDTA<br>Tween 20<br>3,13 % dimetylsulfoxid<br>0,09 % azid sodný<br>< 0,10 % dNTPs<br>< 0,01 % Z05-AS1 DNA polymeráza (mikrobiální)<br>< 0,01 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)<br>(mikrobiální)<br>< 0,01 % Aptamer<br>< 0,01 % upstream a downstream EGFR primery<br>< 0,01 % fluorescenčně značené sondy EGFR | 2 × 0,48 ml      | N/A                             |
|                                                                               | <b>EGFR MMX-2</b><br>(EGFR Master Mix 2)<br>(M/N: 06471382001)<br>Tris pufr<br>Chlorid draselný<br>Glycerol<br>EDTA<br>Tween 20<br>3,13 % dimetylsulfoxid<br>0,09 % azid sodný<br>< 0,10 % dNTPs<br>< 0,01 % Z05-AS1 DNA polymeráza (mikrobiální)<br>< 0,01 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)<br>(mikrobiální)<br>< 0,01 % Aptamer<br>< 0,01 % upstream a downstream EGFR primery<br>< 0,01 % fluorescenčně značené sondy EGFR | 2 × 0,48 ml      | N/A                             |

| Soupravy/Kazety                                                       | Součásti a složky činidel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Množství na test | Bezpečnostní symboly a varování |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------|
| cobas® EGFR<br>Mutation Test v2 Kit<br>24 testů<br>(M/N: 07248563190) | <b>EGFR MMX-3 v2</b><br>(EGFR Master Mix 3)<br>(M/N: 07248601001)<br>Tris pufr<br>Chlorid draselný<br>Glycerol<br>EDTA<br>Tween 20<br>3,13 % dimetylsulfoxid<br>0,09 % azid sodný<br>< 0,10 % dNTPs<br>< 0,01 % Z05-AS1 DNA polymeráza (mikrobiální)<br>< 0,01 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza)<br>(mikrobiální)<br>< 0,01 % Aptamer<br>< 0,01 % upstream a downstream EGFR primery<br>< 0,01 % fluorescenčně značené sondy EGFR | 2 × 0,48 ml      | N/A                             |
|                                                                       | <b>MGAC</b><br>(Octan hořečnatý)<br>(M/N: 05854326001)<br>Octan hořečnatý<br>0,09 % azid sodný                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 6 × 0,2 ml       | N/A                             |
|                                                                       | <b>EGFR MC</b><br>(Kontrola mutace EGFR)<br>(M/N: 06471455001)<br>Tris pufr<br>EDTA<br>Poly-rA RNA (syntetická)<br>0,05 % azid sodný<br>< 0,1 % plazmid DNA obsahující exon 18, 19, 20<br>a 21 sekvence genu EGFR (mikrobiální)<br>< 0,1 % DNA divokého typu genu EGFR (buněčná<br>kultura)                                                                                                                                             | 6 × 0,1 ml       | N/A                             |
|                                                                       | <b>DNA SD</b><br>(Roztok pro ředění vzorků DNA)<br>(M/N: 05854474001)<br>Pufr Tris-HCl<br>0,09 % azid sodný                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2 × 3,5 ml       | N/A                             |

## Uchovávání činidel a manipulace s nimi

| Činidlo                       | Teplota uchovávání | Doba uchovávání                                                                                                                      |
|-------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cobas® EGFR Mutation Test v2* | 2 °C až 8 °C       | Po otevření je stabilní pro 4 použití po dobu 90 dní nebo dokud nevyprší vyznačená doba použitelnosti, podle toho, co nastane dříve. |

\* **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** a pracovní MMX (připravený přidáním **MGAC** do **EGFR MMX-1** nebo **EGFR MMX-2** nebo **EGFR MMX-3 v2**) musí být chráněny před delším vystavením světlu. Pracovní MMX je nutné uchovávat při teplotě 2 °C až 8 °C ve tmě. Připravené vzorky a kontroly musí být přidány během 1 hodiny od přípravy pracovního MMX. S amplifikací je třeba začít do 1 hodiny od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního MMX.

## Další potřebný materiál

| Materiál                                                                                                   | P/N                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>cobas®</b> cfDNA Sample Preparation Kit                                                                 | Roche M/N 07247737190                       |
| Bělidlo                                                                                                    | Kterýkoli dodavatel                         |
| 70% etanol                                                                                                 | Kterýkoli dodavatel                         |
| Sterilní jednorázové sérologické 5ml a 25ml pipety                                                         | Kterýkoli dodavatel                         |
| Mikrotitrační destička pro systém <b>cobas®</b> 4800 (AD destička) a zalepovací fólie                      | Roche 05232724001                           |
| Aplikátor zalepovací fólie pro systém <b>cobas®</b> 4800 (dodávaný s instalací systému <b>cobas®</b> 4800) | Roche 04900383001                           |
| Nastavitelné pipetory* (objem 5–1000 µl)                                                                   | Kterýkoli dodavatel                         |
| Aerosolová bariéra nebo pipetovací špičky s přímým vypuzováním bez DNázy                                   | Kterýkoli dodavatel                         |
| Stolní mikrocetrifuga* (schopná dosáhnout 20 000 × g)                                                      | Eppendorf 5430 nebo 5430R nebo ekvivalentní |
| Mraznička umožňující dosahovat teplot –25 °C až –15 °C                                                     | Kterýkoli dodavatel                         |
| Zkumavky do mikrocetrifugy s víčkem s pojistkou (1,5ml bez RNázy/DNázy, pro PCR)                           | Kterýkoli dodavatel                         |
| Stojany pro kónické zkumavky a zkumavky do mikrocetrifugy                                                  | Kterýkoli dodavatel                         |
| Vířivý mixér (Vortex)*                                                                                     | Kterýkoli dodavatel                         |
| Rukavice na jedno použití bez pudru                                                                        | Kterýkoli dodavatel                         |

\* Veškeré vybavení je nutné udržovat podle pokynů výrobce.

Více informací ohledně samostatně prodávaných materiálů získáte u svého místního zástupce společnosti Roche.

## Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky

| Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Analýzátor <b>cobas®</b> z 480                                                       |
| Řídicí jednotka systému <b>cobas®</b> 4800 se softwarem systému verze 2.2 nebo vyšší |
| EGFR Plasma P1 Analysis Package softwarový verze 1.0 nebo vyšší*                     |
| Čtečka čárového kódu s USB                                                           |
| Tiskárna                                                                             |

\* Aktuální verzi softwaru naleznete v kartě s informacemi o výrobku k sadě **cobas®** EGFR Mutation Test v2 (M/N: 07335873001).

Více informací ohledně samostatně prodávaných materiálů získáte u svého místního zástupce společnosti Roche.

# Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci

## Varování a bezpečnostní opatření

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe.

- Pouze pro účely diagnostiky *in vitro*
- Bezpečnostní listy (SDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- Tento test je určen k použití se vzorky plazmy NSCLC. Vzorky by měly být považovány za infekční materiál a manipulace s nimi by měla být prováděna podle správných laboratorních postupů, které jsou uvedeny v publikaci Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories<sup>16</sup> a v dokumentu CLSI číslo M29-A4.<sup>17</sup>
- Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a špičky na pipety bez DNázy.

## Správná laboratorní praxe

- Nepipetujte ústy.
- V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte.
- Po práci se vzorky a činidly si důkladně umyjte ruce.
- Při práci s jakýmkoliv činidly používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Pokud dojde k rozlití, zřed'te je před vytřením dosucha vodou.
- Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5 % roztokem chlornanu sodného v destilované nebo deionizované vodě (zředěný bělicí prostředek pro domácnosti 1:10). Dále povrch otřete 70 % etanolem.

**Pozn.:** běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný o koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

## Kontaminace

- Je nutné nosit rukavice. Aby nedošlo ke kontaminaci, musí se rukavice vyměňovat mezi manipulací se vzorky a manipulací s činidly testu **cobas** EGFR. Vyvarujte se kontaminaci rukavic při zacházení se vzorky.
- Aby se snížila možnost kontaminace, je nutné často měnit rukavice.
- Rukavice se musí vyměnit před opuštěním prostor určených pro izolaci DNA nebo v případě podezření, že došlo ke kontaktu s roztoky nebo vzorky.
- Zamezte mikrobiální a ribonukleázové kontaminaci činidel.
- Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou MMX pečlivě vyčistit. Přístroje a potřebné pomůcky by měly být určeny pro každý z těchto kroků samostatně a neměly by být použity pro jinou činnost ani přenášeny. Např. pipetory a spotřební materiál používané pro izolaci DNA se nesmí používat k přípravě činidel pro amplifikaci a detekci.
- Velmi doporučujeme jednosměrný pracovní postup – zahájit nový krok až po kompletním dokončení předchozího kroku. Např. před amplifikací a detekcí je nutné dokončit izolaci DNA. Izolaci DNA je nutné provést na jiném místě než amplifikaci a detekci. Aby nedošlo ke kontaminaci pracovního Master Mixu vzorky DNA, je nutné před přípravou pracovního Master Mixu pečlivě vyčistit pracovní plochu.

## Integrita

- Nepoužívejte soupravy po uplynutí data použitelnosti.
- Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav nebo šarží.
- Položky k jednorázovému použití nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
- Všechny položky k jednorázovému použití použijte jen jednou. Nepoužívat opakovaně.
- Veškeré vybavení je nutné řádně udržovat podle pokynů výrobce.

## Likvidace

- **DNA EB, MGAC, EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2, EGFR MC a DNA SD** obsahují azid sodný. Ten může reagovat s olověným nebo měděným potrubím a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Při likvidaci roztoků obsahujících azid sodný do laboratorního umyvadla propláchněte odtok velkým množstvím studené vody, abyste tak zabránili vytváření azidů.
- Nespotřebovaná činidla a odpad likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.

## Rozlití a čištění

- Pokud dojde k rozlití na přístroj **cobas® 4800**, postupujte při čištění podle pokynů v příslušném Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.
- Pro čištění analyzátoru **cobas® z 480** nepoužívejte roztok chlornanu sodného (bělidlo). Vyčistěte analyzátor **cobas® z 480** podle postupů popsanych v příslušném Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.
- Další varování, upozornění a postupy pro snížení nebezpečí kontaminace analyzátoru **cobas® z 480** najdete v Návodu k použití systému **cobas® 4800** nebo v Asistentu uživatele systému **cobas® 4800**.

## Odběr, přeprava a uchovávání vzorků

***Pozn.:** se všemi vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními.*

### Odběr vzorků a manipulace s nimi

#### Odběrová zkumavka Roche Cell-Free DNA

Plazma z plné krve odebrané do odběrových zkumavek Roche Cell-Free DNA (zkumavek Roche cfDNA) byla validována pro použití s testem **cobas** EGFR.

Plazma má být oddělena z krve odebrané do zkumavek Roche cfDNA do 7 dní po odběru. Vzorky krve odebrané do zkumavek Roche cfDNA jsou stabilní 7 dní, jsou-li uchovávány nebo přepravovány při 15–25 °C, s dočasnými odchylkami na 15–30 °C po dobu až 16 hodin. Po oddělení plazmy uchovávejte podle pokynů v oddíle **Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků** níže.

***Pozn.:** v plazmě oddělené z krve odebrané do zkumavky Roche cfDNA byla pozorována hemolýza. Ukázalo se však, že při koncentraci hemoglobinu  $\leq 2,0$  g/l nedochází k interferenci s účinností testu **cobas** EGFR.*

Odběrová zkumavka K2 EDTA

Plazma z plné krve odebrané do zkumavek K2 EDTA byla validována pro použití s testem **cobas** EGFR.

Plnou krev s K2 EDTA lze uchovávat až 8 hodin při  $\leq 30\text{ °C}$ . Po oddělení plazmy uchovávejte podle pokynů v oddíle **Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků** níže.

**Přeprava, uchovávání a stabilita vzorků**

Při přepravě vzorků plazmy je třeba dodržovat celostátní i místní předpisy o přepravě etiologických agens.<sup>18</sup>

Vzorky plazmy jsou stabilní v následujících podmínkách:

| Teplota uchovávání vzorků plazmy       | $\leq -70\text{ °C}$ | $-15\text{ °C až }-25\text{ °C}$ | $2\text{ °C až }8\text{ °C}$ | $15\text{ °C až }30\text{ °C}$ |
|----------------------------------------|----------------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Doba uchovávání pro plazmu Roche cfDNA | Až 30 dní            | Až 30 dní                        | Až 7 dní                     | Až 1 den                       |
| Doba uchovávání pro plazmu K2 EDTA     | Až 12 měsíců         | Až 12 měsíců                     | Až 3 dní                     | Až 1 den                       |

**Skladování a stabilita zpracovaných vzorků**

Zpracovaný vzorek (extrahovaná cfDNA) z plazmy získané ze zkumavky Roche cfDNA nebo ze zkumavky K2 EDTA je stabilní v následujících podmínkách:

| Teplota uchovávání extrahované cfDNA | $-15\text{ °C až }-25\text{ °C}$                  | $2\text{ °C až }8\text{ °C}$ | $15\text{ °C až }30\text{ °C}$ |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Doba uchovávání                      | Až 2 cykly zmrazení a rozmrazení v průběhu 60 dní | Až 21 dní                    | Až 7 dní                       |

Extrahovanou cfDNA je nutné použít v doporučené době uchovávání nebo před datem expirace soupravy pro přípravu vzorků **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit, podle toho, co nastane dříve.

Před použitím extrahované uchované zásobní DNA proveďte promíchání pulzním vířením a odstřed'te eluční zkumavku obsahující zásobní.

# Postup testu

## Spuštění testu

**Obrazek 6 Pracovní postup testu cobas EGFR se soupravou cobas® cfDNA Sample Preparation Kit**

|    |                                                         |
|----|---------------------------------------------------------|
| 1  | Spustíte systém.                                        |
| 2  | Provedte údržbu přístroje.                              |
| 3  | Odstraňte vzorky a činidla z místa uchovávání.          |
| 4  | Připravte vzorek na navázání na kolonu.                 |
| 5  | Provedte izolaci DNA.                                   |
| 6  | Eluujte DNA.                                            |
| 7  | Vytvořte objednávku a vytiskněte rozložení destičky.    |
| 8  | Připravte amplifikační činidla.                         |
| 9  | Nadávkujte amplifikační činidla na AD destičku.         |
| 10 | Nadávkujte vzorky na AD destičku.                       |
| 11 | Zalepte AD destičku.                                    |
| 12 | Vložte AD destičku do analyzátoru <b>cobas® z 480</b> . |
| 13 | Spustíte cyklus.                                        |
| 14 | Zkontrolujte výsledky.                                  |
| 15 | S LIS: odešlete výsledky do LIS.                        |
| 16 | Vyprázdněte analyzátor.                                 |

## Návod k použití

**Pozn.:** pouze plazma oddělená z krve odebrané do zkumavky Roche cfDNA nebo zkumavky K2 EDTA je validovaná pro použití s testem **cobas EGFR**.

**Pozn.:** viz uživatelská příručka pro analyzátor **cobas® z 480**, kde najdete podrobné postupy pro analyzátor **cobas® z 480**.

## Velikost cyklu

Jeden cyklus může zahrnovat 1 až 30 vzorků (plus kontroly) na AD destičce s 96 jamkami. Při zpracování více než 24 vzorků bude nutné použít více souprav testů **cobas EGFR**.

Souprava testu **cobas EGFR** obsahuje množství činidel dostatečné pro testování 3 vzorků v 8 cyklech (plus kontroly), tj. maximálně 24 vzorků na soupravu.

## Kontrola celého procesu

Tento test vyžaduje negativní kontrolu pro celý proces. Pro každý cyklus zpracujte negativní kontrolu současně se vzorkem či vzorky počínaje od postupu izolace DNA.

## Izolace DNA

DNA je izolována ze vzorků plazmy s použitím soupravy **cobas® cfDNA Sample Preparation Kit** (M/N 07247737190).

## Amplifikace a detekce

**Pozn.:** aby nedošlo ke kontaminaci pracovního MMX vzorky DNA, musí se amplifikace a detekce provádět v místě odděleném od izolace DNA. Pracoviště pro amplifikaci a detekci je nutno před přípravou MMX pečlivě vyčistit. Při pečlivém vyčištění je nutné všechny stojany a pipetory řádně otřít 0,5% roztokem chlornanu sodného a poté otřít 70% roztokem etanolu. Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný o koncentraci 5,25 %. Roztok chlornanu sodného o koncentraci 0,5 % tak získáte zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.

## Nastavení přístroje

Viz Návod k použití systému **cobas®** 4800 nebo Asistent uživatele systému **cobas®** 4800, kde najdete podrobné pokyny pro nastavení analyzátoru **cobas®** z 480.

## Nastavení objednávky testu

Podrobné pokyny k pracovnímu postupu EGFR naleznete v Návodu k použití systému **cobas®** 4800 nebo v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800.

Vytvořte rozvržení destičky, na které budou pozice všech vzorků a kontrol cyklu. V cyklu, který obsahuje pouze vzorky plazmy, se kontrola mutace (MC) vloží na destičku na pozice **A01–A03**. Negativní kontrola (**NEG**) se vloží na destičku na pozice **B01–B03**. Vzorky se poté přidávají v sadách po třech sloupcích počínaje **C01–C03** až **H10–H12**, viz Obrázek 7.

Test **cobas** EGFR může být prováděn v kombinovaném režimu testování (např. EGFR tkáň s EGFR plazmou). Pozice kontrol se mohou lišit podle vybraných testů a čísel vzorků. Další podrobnosti o nastavení cyklu kombinovaného testu naleznete v Návodu k použití softwaru systému testu **cobas®** EGFR Mutation Test v2, v Návodu k použití systému **cobas®** 4800 nebo v Asistentu uživatele systému **cobas®** 4800.

**Obrázek 7 Rozvržení destičky pro test cobas EGFR**

| Řada / Sloupec | 01           | 02           | 03                 | 04           | 05           | 06                 | 07           | 08           | 09                 | 10           | 11           | 12                 |
|----------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------|
| <b>A</b>       | MC<br>MMX 1  | MC<br>MMX 2  | MC<br>MMX 3<br>v2  | S7<br>MMX 1  | S7<br>MMX 2  | S7<br>MMX 3<br>v2  | S15<br>MMX 1 | S15<br>MMX 2 | S15<br>MMX 3<br>v2 | S23<br>MMX 1 | S23<br>MMX 2 | S23<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>B</b>       | NEG<br>MMX 1 | NEG<br>MMX 2 | NEG<br>MMX 3<br>v2 | S8<br>MMX 1  | S8<br>MMX 2  | S8<br>MMX 3<br>v2  | S16<br>MMX 1 | S16<br>MMX 2 | S16<br>MMX 3<br>v2 | S24<br>MMX 1 | S24<br>MMX 2 | S24<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>C</b>       | S1<br>MMX 1  | S1<br>MMX 2  | S1<br>MMX 3<br>v2  | S9<br>MMX 1  | S9<br>MMX 2  | S9<br>MMX 3<br>v2  | S17<br>MMX 1 | S17<br>MMX 2 | S17<br>MMX 3<br>v2 | S25<br>MMX 1 | S25<br>MMX 2 | S25<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>D</b>       | S2<br>MMX 1  | S2<br>MMX 2  | S2<br>MMX 3<br>v2  | S10<br>MMX 1 | S10<br>MMX 2 | S10<br>MMX 3<br>v2 | S18<br>MMX 1 | S18<br>MMX 2 | S18<br>MMX 3<br>v2 | S26<br>MMX 1 | S26<br>MMX 2 | S26<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>E</b>       | S3<br>MMX 1  | S3<br>MMX 2  | S3<br>MMX 3<br>v2  | S11<br>MMX 1 | S11<br>MMX 2 | S11<br>MMX 3<br>v2 | S19<br>MMX 1 | S19<br>MMX 2 | S19<br>MMX 3<br>v2 | S27<br>MMX 1 | S27<br>MMX 2 | S27<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>F</b>       | S4<br>MMX 1  | S4<br>MMX 2  | S4<br>MMX 3<br>v2  | S12<br>MMX 1 | S12<br>MMX 2 | S12<br>MMX 3<br>v2 | S20<br>MMX 1 | S20<br>MMX 2 | S20<br>MMX 3<br>v2 | S28<br>MMX 1 | S28<br>MMX 2 | S28<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>G</b>       | S5<br>MMX 1  | S5<br>MMX 2  | S5<br>MMX 3<br>v2  | S13<br>MMX 1 | S13<br>MMX 2 | S13<br>MMX 3<br>v2 | S21<br>MMX 1 | S21<br>MMX 2 | S21<br>MMX 3<br>v2 | S29<br>MMX 1 | S29<br>MMX 2 | S29<br>MMX 3<br>v2 |
| <b>H</b>       | S6<br>MMX 1  | S6<br>MMX 2  | S6<br>MMX 3<br>v2  | S14<br>MMX 1 | S14<br>MMX 2 | S14<br>MMX 3<br>v2 | S22<br>MMX 1 | S22<br>MMX 2 | S22<br>MMX 3<br>v2 | S30<br>MMX 1 | S30<br>MMX 2 | S30<br>MMX 3<br>v2 |

Kde: MC = kontrola mutace, NEG = negativní kontrola, S# = ID vzorku a MMX # odpovídá činidlu Master Mix 1, 2 nebo 3 v2.

**Pozn.:** aby byla získána odpověď, musí být každý vzorek rozdělen mezi tři sousední sloupce v jedné řadě.

**Pozn.:** pracovní Master Mix 1 musí být na destičce ve sloupcích 01, 04, 07 a 10. pracovní Master Mix 2 musí být na destičce ve sloupcích 02, 05, 08 a 11. Pracovní Master Mix 3 v2 musí být na destičce ve sloupcích 03, 06, 09 a 12.

**Pozn.:** na jednu destičku je možné dát až 30 vzorků. Jestliže je ke zpracování všech vzorků na destičce nutná více než jedna souprava činidel, všechny soupravy činidel musí být ze stejné šarže.

## Nastavení reakce

### Příprava pracovního Master Mixu (MMX-1, MMX-2 a MMX-3 v2)

**Pozn.:** *EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 a pracovní MMX jsou citlivé na světlo a je nutné je chránit před dlouhodobým působením světla.*

**Pozn.:** *vzhledem k viskozitě činidel EGFR MMX a pracovního MMX pipetujte pomalu, aby došlo k vypuzení veškeré směsi ze špičky.*

**Pozn.:** *EGFR MMX-1, EGFR MMX-2 a EGFR MMX-3 v2 se mohou zdát světle modré/nařinčované. To nemá vliv na účinnost činidel.*

**Pozn.:** *do jednotlivých 1,5ml zkumavek pro mikrocentrifugu připravte tři pracovní MMX, jednu s obsahem EGFR MMX-1, jednu s obsahem EGFR MMX-2, a jednu s obsahem EGFR MMX-3 v2.*

1. Vypočítejte objem požadovaného **EGFR MMX-1** nebo **EGFR MMX-2** nebo **EGFR MMX-3 v2** pro každý pracovní MMX pomocí následujícího vzorce:

$$\text{Objem požadovaného EGFR MMX-1 nebo EGFR MMX-2 nebo EGFR MMX-3 v2} = (\text{počet vzorků} + 2 \text{ kontroly} + 1) \times 20 \mu\text{l}$$

2. Vypočítejte objem potřebného **MGAC** pro každý pracovní MMX pomocí následujícího vzorce:

$$\text{Objem požadovaného MGAC} = (\text{počet vzorků} + 2 \text{ kontroly} + 1) \times 5 \mu\text{l}$$

Tab. 22 se používá k stanovení objemu každého činidla potřebného pro přípravu pracovního MMX na základě počtu vzorků v cyklu.

**Tab. 22 Objemy činidel potřebných pro pracovní MMX-1, pracovní MMX-2 a pracovní MMX-3 v2**

|                                                        |                  | Počet vzorků* |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------------------------------------------|------------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                                        |                  | 1             | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
| MMX                                                    | 20 $\mu\text{l}$ | 80            | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 | 200 | 220 | 240 | 260 |
| MGAC                                                   | 5 $\mu\text{l}$  | 20            | 25  | 30  | 35  | 40  | 45  | 50  | 55  | 60  | 65  |
| Celkový objem každého pracovního MMX ( $\mu\text{l}$ ) |                  | 100           | 125 | 150 | 175 | 200 | 225 | 250 | 275 | 300 | 325 |

\* Objem pro počet vzorků je založen na součtu počtu vzorků + 2 kontroly + 1.

3. Vyjměte příslušný počet lahvíček **EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2** a **MGAC** z místa uchovávání o teplotě 2 °C až 8 °C. Před použitím každé činidlo míchejte 5 sekund vířením, a shromážděte kapalinu ve spodní části zkumavky. Označte sterilní zkumavku pro mikrocentrifugu pro pracovní MMX-1, pracovní MMX-2 a pracovní MMX-3 v2.
4. Přidejte vypočítaný objem **EGFR MMX-1** nebo **EGFR MMX-2** nebo **EGFR MMX-3 v2** do odpovídajících zkumavek pro pracovní MMX.
5. Přidejte vypočtený objem **MGAC** do zkumavek s pracovním MMX.
6. Zkumavky vířením po dobu 3 až 5 sekund promíchejte, aby došlo k dostatečnému promíchání.

**Pozn.:** *vzorky a kontroly je nutné dát na AD-destičku do jedné hodiny po přípravě pracovních MMX.*

**Pozn.:** *používejte pouze AD destičku pro systém cobas® 4800 se zalepovací fólií.*

## Příprava destičky

**Pozn.:** pokud používáte uchovanou zásobní DNA, řiďte se pokyny v části **Přepřava, uchovávání a stabilita vzorků**.

1. Do každé reakční jamky na AD destičce, která je potřebná pro cyklus, přidejte 25 µl pracovního MMX. Špička pipety se nesmí dotknout destičky mimo danou jamku.
  - Do jamek AD destičky ve sloupcích 01, 04, 07 a 10 přidejte podle potřeby pracovní MMX-1 (obsahující **EGFR MMX-1**).
  - Do jamek AD destičky ve sloupcích 02, 05, 08 a 11 přidejte podle potřeby pracovní MMX-2 (obsahující **EGFR MMX-2**).
  - Do jamek AD destičky ve sloupcích 03, 06, 09 a 12 přidejte podle potřeby pracovní MMX-3 v2 (obsahující **EGFR MMX-3 v2**).
2. Napipetujte 25 µl **EGFR MC** do jamek **A01**, **A02** a **A03** AD destičky; pipetou dobře promíchejte – nasajte a vytlačte z pipety v jamce alespoň dvakrát.
3. Pomocí nové pipetovací špičky napipetujte 25 µl **NEG** do jamek **B01**, **B02** a **B03** na AD destičce a pomocí pipety dobře promíchejte – nasajte a vytlačte z pipety v jamce alespoň dvakrát.

**Pozn.:** každý cyklus musí obsahovat **EGFR MC** v jamkách **A01**, **A02** a **A03** a **NEG** v jamkách **B01**, **B02** a **B03**.  
V opačném případě analyzátor cobas® z 480 cyklus zneplatní.

**Pozn.:** podle potřeby měňte rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci mezi vzorky a kontaminaci PCR reakční zkumavky zvnějšku.

4. Pomocí nových pipetovacích špiček pro každý vzorek DNA přidejte 25 µl prvního vzorku DNA do jamek **C01**, **C02** a **C03** na AD destičce; pro přidání vzorku DNA do každé jamky použijte novou špičku; pomocí pipety každou jamku dobře promíchejte – nasajte a vytlačte z pipety v jamce alespoň dvakrát. Zopakujte tento postup pro DNA z každého vzorku a postupujte podle vzoru (Obrázek 7), dokud nebudou všechny vzorky DNA nanášeny na AD destičce. Ujistěte se, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamek.

**Pozn.:** před použitím uchované zásobní DNA proveďte promíchání pulzním vířením a odstředte eluční zkumavku obsahující zásobní.

5. Zalepte AD destičku zalepovací fólií (dodanou s destičkami). Pomocí aplikátoru zalepovací fólie přilepte zalepovací fólii pevně k AD destičce.
6. Před zahájením PCR se ujistěte, že je veškerá kapalina umístěna na dně jamek.

**Pozn.:** amplifikace a detekce musí začít do 1 hodiny od okamžiku přidání prvního ředění vzorku DNA do pracovního MMX.

## Zahájení PCR

Podrobné pokyny ke krokům pracovního postupu EGFR naleznete v Návodu k použití systému cobas® 4800 nebo v Asistentu uživatele systému cobas® 4800. Jakmile se objeví vyskakovací okno „Select test“, vyberte „EGFR Plasma P1“ a klikněte na tlačítko „OK“.

# Výsledky

## Vyhodnocení výsledků

**Pozn.:** veškerou validaci cyklů a vzorků provádí software **cobas® 4800**.

**Pozn.:** platný cyklus může zahrnovat jak platné tak i neplatné výsledky vzorků.

Jestliže je cyklus platný, lze výsledky vzorků interpretovat způsobem který uvádí Tab. 23.

**Tab. 23 Interpretace výsledků testu cobas EGFR**

| Výsledky testu              | Výsledek mutace                                                                                              | Výsledek semikvantitativního indexu (SQI)                                                                                                       | Interpretace                                                                                                                                                     |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mutation Detected           | Ex19Del<br>S768I<br>L858R<br>T790M<br>L861Q<br>G719X<br>Ex20Ins<br>(Může být přítomna více než jedna mutace) | Ex19Del: SQ/<br>S768I: SQ/<br>L858R: SQ/<br>T790M: SQ/<br>L861Q: SQ/<br>G719X: SQ/<br>Ex20Ins: SQ/<br>(Může být přítomna více než jedna mutace) | Byla detekována mutace ve specifické cílové oblasti EGFR.                                                                                                        |
| No Mutation Detected (NMD)* | N/A                                                                                                          | N/A                                                                                                                                             | Nedošlo k detekci mutace v cílových oblastech EGFR                                                                                                               |
| Invalid                     | N/A                                                                                                          | N/A                                                                                                                                             | Výsledek vzorku je neplatný. Opakujte testování vzorků s neplatnými výsledky podle pokynů v části níže <b>Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky</b> . |
| Failed                      | N/A                                                                                                          | N/A                                                                                                                                             | Neúspěšný cyklus způsobený poruchou hardwaru nebo softwaru. Vyžádejte si od místního zastoupení společnosti Roche technickou pomoc.                              |

\* Výsledek „No Mutation Detected“ nevylučuje přítomnost mutace v cílových oblastech EGFR, protože výsledky závisí na koncentraci mutantních sekvencí, dostatečné integritě vzorku, nepřítomnosti inhibitorů a dostatečném množství detekované DNA.

Značky (příznaky) výsledků lze najít na záložce „Results“ (Výsledky) (obrazovka) nebo ve sloupci „Flags“ (Příznaky) (zpráva). Více podrobností naleznete v části viz část **Značky výsledků**.

## Semikvantitativní index (SQI)

SQI je semikvantitativní měření množství mutantní cfDNA ve vzorku, které lze použít k měření rozdílů mutantní zátěže v čase. Nárůst hodnoty SQI indikuje nárůst množství odpovídající cílové mutace v jednotlivém vzorku, zatímco pokles hodnoty SQI indikuje snížení celkového množství odpovídající cílové mutace v jednotlivém vzorku. Reprezentativní výsledky SQI pro každou třídu mutace EGFR detekované testem jsou ukázány ve výsledcích linearity na Obrázek 8 – Obrázek 14.

## Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky

1. Jestliže je cyklus neplatný, nebude dostatečný objem extrahované DNA každého vzorku na to, aby bylo možné zopakovat amplifikaci a detekci. Opakujte celý proces testu se všemi vzorky a začněte izolací DNA.
2. Jestliže je cyklus platný, ale vzorek je neplatný, nebude dostatečný objem extrahované DNA každého vzorku na to, aby bylo možné zopakovat amplifikaci a detekci. Opakujte celý proces testu s neplatným vzorkem a začněte izolací DNA.

## Kontrola kvality a platnost výsledků

Každý cyklus pro až 30 vzorků zahrnuje jednu sadu kontrol mutace testu **cobas** EGFR (**EGFR MC**) (jamky **A01**, **A02** a **A03**) a negativních kontrol (**NEG**) (jamky **B01**, **B02** a **B03**) pro pracovní MMX-1, pracovní MMX-2 a pracovní MMX-3 v2. Cyklus je platný, pokud jsou **EGFR MC** a **NEG** platné. Pokud jsou **EGFR MC** nebo **NEG** neplatné, je celý cyklus neplatný a musí se zopakovat.

### Kontrola mutace

Výsledek **EGFR MC** musí být „Valid“. Pokud jsou výsledky kontroly **EGFR MC** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

### Negativní kontrola

Výsledek kontroly **NEG** musí být „Valid“. Pokud jsou výsledky kontroly **NEG** soustavně neplatné, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

## Procedurální omezení

1. Testujte pouze indikované typy vzorků. Test **cobas** EGFR byl validován pro použití s plazmou oddělenou z krve odebrané do zkumavky Roche cfDNA nebo zkumavky K2 EDTA.
2. Účinnost testu **cobas** EGFR byla validována pomocí soupravy **cobas**® cfDNA Sample Preparation Kit.
3. Detekce mutace závisí na tom, kolik kopií genu je ve vzorku přítomno, a vliv mohou mít i integrity vzorku, množství izolované DNA a přítomnost interferenčních látek.
4. K získání spolehlivých výsledků je třeba dodržovat příslušné postupy transportu, uchovávání a zpracování vzorků. Postupujte dle kroků uvedených v tomto Návodu k použití systému **cobas**® 4800 a v Asistentu uživatele systému **cobas**® 4800.
5. Pipetování ze dna eluční zkumavky může narušit peletu a nepříznivě ovlivnit výsledky testu.
6. Přidání enzymu AmpErase k činidlu Master Mix testu **cobas** EGFR umožňuje selektivní amplifikaci cílové DNA. Aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy uvedené v tomto návodu k použití.
7. Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v technikách PCR a v používání systému **cobas**® 4800.
8. Pouze analyzátor **cobas**® z 480 byl validován pro použití s tímto produktem. S tímto produktem se nesmí používat žádný jiný termocykler s optickou detekcí v reálném čase.
9. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem k jiné technologii provedli ve své laboratoři korelační metodické studie a posoudili rozdíly mezi technologiemi.
10. Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.
11. I když vzácně, mutace v oblastech genomické DNA genu EGFR pokryté primery a/nebo sondami testu **cobas** EGFR mohou vést k selhání detekce mutace v exonech 18, 19, 20 a 21 (výsledek „No Mutation Detected“).
12. Test **cobas** EGFR vykazuje zkříženou reaktivitu (výsledek „Mutation Detected“) u mutace L747S v exonu 19, což je vzácně se vyskytující mutace, která může způsobit rezistenci vůči léčbě TKI.<sup>19</sup>

13. Vzorky testované při vysokých koncentracích ( $> 10^5$  kopií/ml) mohou poskytnout falešné výsledky.
14. Test **cobas** EGFR byl validován k použití s 25 µl zásobní DNA na reakční jamku. Nedoporučuje se použití menšího množství zásobní DNA než 25 µl na reakční jamku.
15. Výše uvedený postup musí být dodržen, aby bylo možné detekovat  $\geq 100$  kopií mutační DNA na ml plazmy oddělené z krve odebrané do zkumavky Roche cfDNA nebo zkumavky K2 EDTA pro mutace EGFR, který uvádí Tab. 3.
16. Vzorky s výsledky „No Mutation Detected“ mohou obsahovat mutace EGFR, které tento test nedetekuje.
17. Je nutné zvážit výsledek „No Mutation Detected“ ve vzorcích plazmy, který může odrážet nebo být potvrzen testováním tkáně.
18. Plazma získaná z plné krve odebrané do zkumavky Roche cfDNA stačí pouze na jednorázové testování.
19. Plazma z odběrů, které nebyly pacientovi odebrány v tutéž dobu, se nemá kombinovat.
20. Účinnost testu **cobas** EGFR nebyla stanovena u sražených vzorků odebraných do zkumavky Roche cfDNA. Sražené vzorky je třeba odmítnout a odebrat pacientovi nové vzorky.
21. V plazmě oddělené z krve odebrané do zkumavky Roche cfDNA byla pozorována hemolýza. Při koncentraci hemoglobinu  $> 2,0$  g/l může docházet k interferenci s účinností testu **cobas** EGFR.

# Hodnocení neklinických funkčních parametrů

## Analytické parametry

Následující údaje ukazují analytické funkční parametry testu **cobas** EGFR.

## Analytická citlivost – limit slepého vzorku

Pro vyhodnocení účinnosti testu **cobas** EGFR v případě absence templátu a pro ujištění, že slepý vzorek negeneruje analytický signál, který by mohl ukazovat na nízkou koncentraci mutace, byly vyhodnoceny vzorky EGFR divokého typu v plazmě s K2 EDTA od zdravých dárců. Pomocí analýzy předepsané v pokynech CLSI EP17-A2<sup>20</sup> byl limit slepého vzorku stanoven jako nulový pro všechny mutace.

## Mez detekce pomocí DNA z buněčné linie

### K2 EDTA plazma

DNA z buněčných linií obsahujících každou ze sedmi mutačních tříd detekovaných testem byly přidány do plazmy K2 EDTA zdravého dárce s genem EGFR divokého typu. Byly připraveny série ředění a bylo testováno 24 replikátů každého člena panelu s použitím každé ze tří šarží sad testu **cobas** EGFR.

Mez detekce byla stanovena pro každou ze sedmi mutačních tříd detekovaných testem jako nejnižší koncentrace DNA, která vykazala výsledek „Mutation Detected“ v míře nejméně 95 % pro cílovou mutaci EGFR. Výsledky uvádí Tab. 24.

Tab. 24 Mez detekce testu **cobas** EGFR s K2 EDTA plazmou

| Exon EGFR | Skupina mutace EGFR | Sekvence nukleové kyseliny EGFR | LoD intaktní* DNA (kopie/ml) | LoD fragmentované** DNA (kopie/ml) | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|-----------|---------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 18        | G719A               | 2156G>C                         | 100                          | 100                                | 6239                    |
| 19        | Ex19Del             | 2235_2249del15                  | 25                           | 75                                 | 6223                    |
| 20        | T790M               | 2369C>T                         | 25                           | 100                                | 6240                    |
| 20        | S768I               | 2303G>T                         | 20                           | 25                                 | 6241                    |
| 20        | Ex20Ins             | 2307_2308ins9GCCAGCGTG          | 80                           | 25                                 | 12376                   |
| 21        | L858R               | 2573T>G                         | 10                           | 100                                | 6224                    |
| 21        | L861Q               | 2582T>A                         | 30                           | 30                                 | 6213                    |

Rozdíly v LoD jsou způsobeny rozdíly na pozadí DNA.

\* Intaktní DNA z buněčné linie měla na pozadí DNA WT (divokého typu) přibližně 10 000 kopií/ml.

\*\* DNA z buněčné linie mechanicky fragmentované na průměrnou velikost 220 bp měla na pozadí DNA WT přibližně 100 000 kopií/ml.

### Plazma Roche cfDNA

U plazmy oddělené z krve odebrané do zkumavky Roche cfDNA byly hodnoty LoD ověřeny přidáním fragmentované DNA z buněčných linií obsahujících každou ze sedmi mutačních tříd detekovaných testem do plazmy Roche cfDNA zdravého dárce s genem EGFR divokého typu. Byla připravena ředění dosahující koncentrací LoD uvedených v Tab. 24 a 20 replikátů každého vzorku bylo testováno pomocí testů **cobas** EGFR z jedné šarže soupř. Pozorovaná míra detekce u každé mutace byla 100 %.

Můžeme shrnout, že test **cobas** EGFR dokáže detekovat mutace exonu 18, 19, 20 a 21 genu EGFR při  $\leq 100$  kopiích mutantní DNA na ml plazmy při použití standardního objemu 25  $\mu$ l zásobní DNA na reakční jamku u plazmy s K2 EDTA i u plazmy Roche cfDNA.

## Zkřížená reaktivita na jiné mutace na exonech 18, 19, 20 a 21

### Vzorky z prodloužení studie AURA a klinické studie AURA2

Test **cobas** EGFR ukázal výsledky „Mutation Detected“ pro následující mutace genu EGFR pozorované na vzorcích z prodloužení studie AURA a klinické studie AURA2 (Tab. 25). Prodloužení studie AURA bylo použito k doplnění vzorků v kohortě AURA2 a zvýšení pravděpodobnosti detekce vzácných mutací v plazmě. Analytické funkční parametry testu **cobas** EGFR při detekci těchto mutací nebyly hodnoceny.

**Tab. 25** Mutace detekované v prodloužení AURA a studii AURA2, u nichž byla zjištěna zkřížená reakce s testem **cobas** EGFR

| Exon | Sekvence mutace   | Změna aminokyselin | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| 19   | 2236_2256>ATC     | E746_S752>I        | 133190                  |
|      | 2237_2258>TATC    | E746_P753>VS       | Nenalezeno              |
|      | 2239_2256>CAG     | L747_S752>Q        | Nenalezeno              |
|      | 2239_2264>GCCAA   | L747_A755>AN       | 85891                   |
|      | 2240_2264>CGAGAGA | L747_A755>SRD      | Nenalezeno              |

### Specifita – mikroorganismy

Specifita testu **cobas** EGFR byla vyhodnocena testováním *Staphylococcus epidermidis* při hodnotě  $1 \times 10^6$  CFU, u níž bylo zjištěno, že nezpůsobuje zkříženou reakci ani interferenci s testem **cobas** EGFR při přidání ke vzorkům plazmy s K2 EDTA zdravých dárců obsahujících sekvenční EGFR divokého typu a mutantního EGFR.

### Interference

#### K2 EDTA plazma

U triglyceridů (37 mM, vysoká koncentrace doporučená CLSI<sup>21</sup>), 0,2 g/l bilirubinu (nekonjugovaného nebo konjugovaného, vysoká koncentrace doporučená CLSI<sup>21</sup>) a hemoglobinu (1,5 g/l) se neprokázala interference s testem **cobas** EGFR při přidání potenciálně interferující látky k plazmě s K2 EDTA od zdravých dárců obsahující sekvenční EGFR divokého typu a mutací EGFR. Ukázalo se, že hemoglobin při koncentraci 2,0 g/l v plazmě interferoval s testem **cobas** EGFR. Albumin při koncentraci  $\geq 60$  g/l (60 g/l, vysoká koncentrace doporučená CLSI<sup>21</sup>) může interferovat s testem **cobas** EGFR.

Výsledky studie prokazují, že EDTA, Neupogen a TARCEVA® neinterferují s účinností testu **cobas** EGFR, pokud byly přidány potenciálně interferující látky ke vzorkům plazmy s K2 EDTA od zdravých dárců obsahujícím sekvenční EGFR divokého typu a mutací EGFR.

#### Plazma Roche cfDNA

Ukázalo se, že u Triglyceridů (37 mM, CLSI doporučená vysoká koncentrace<sup>21</sup>), 0,2 g/l bilirubinu (nekonjugovaného nebo konjugovaného, CLSI doporučená vysoká koncentrace<sup>21</sup>), hemoglobinu (2,0 g/l), a albuminu (60 g/l, CLSI doporučená vysoká koncentrace<sup>21</sup>) nedochází k interferenci s účinností testu **cobas** EGFR, pokud byly potenciálně interferující látky přidány ke vzorkům plazmy Roche cfDNA zdravého dárce obsahujícím sekvenční divokého typu a mutací EGFR.

## Linearita

### K2 EDTA plazma

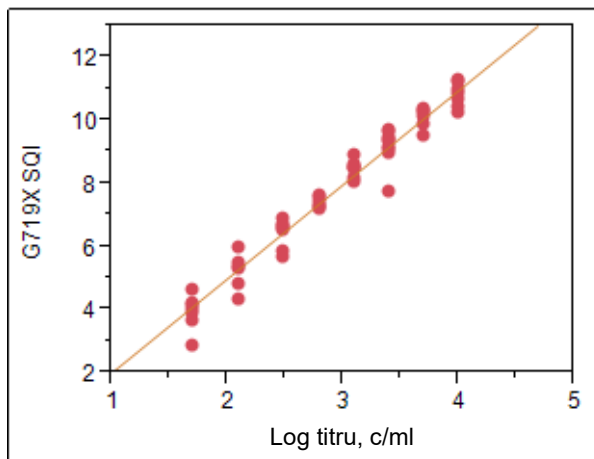
Studie linearity testu **cobas** EGFR byla provedena pomocí sérií ředění nejméně 8 členů panelu v rozsahu lineárního rozmezí převládající mutace každé třídy mutace genu EGFR vykázané testem. Členy panelu byly připraveny naředěním DNA z buněčné linie obsahující každou z převládajících mutací do vzorků plazmy K2 EDTA genu EGFR divokého typu. Vyhodnocení bylo provedeno podle pokynů CLSI číslo EP06-A.<sup>24</sup> Bylo testováno deset replikátů každého člena panelu s použitím 2 šarží sad s koncentracemi až 1,0E+04 kopií/ml (celkem 20 replikátů na každou hladinu). Pro hladiny nad 1,0E+04 kopií/ml byl testován jeden replikát na šarži.

Lineární rozmezí každé třídy mutace testu **cobas** EGFR je uvádí Tab. 26 a odpovídající grafy pro jednu šarži viz Obrázek 8 až Obrázek 14.

**Tab. 26** Lineární rozmezí testu **cobas** EGFR s K2 EDTA plazmou

| Exon EGFR | Mutace EGFR     | Cílová sekvence nukleové kyseliny | Lineární rozmezí (kopie/ml) |
|-----------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 18        | G719A           | 2156G>C                           | 50 – 1E+04                  |
| 19        | Exon 19 delece  | 2235_2249del15                    | 10 – 1E+05                  |
| 20        | S768I           | 2303G>T                           | 10 – 1E+05                  |
| 20        | T790M           | 2369C>T                           | 50 – 1E+05                  |
| 20        | Exon 20 inzerce | 2307_2308ins9GCCAGCGTG            | 10 – 1E+05                  |
| 21        | L858R           | 2573T>G                           | 10 – 1E+05                  |
| 21        | L861Q           | 2582T>A                           | 10 – 1E+05                  |

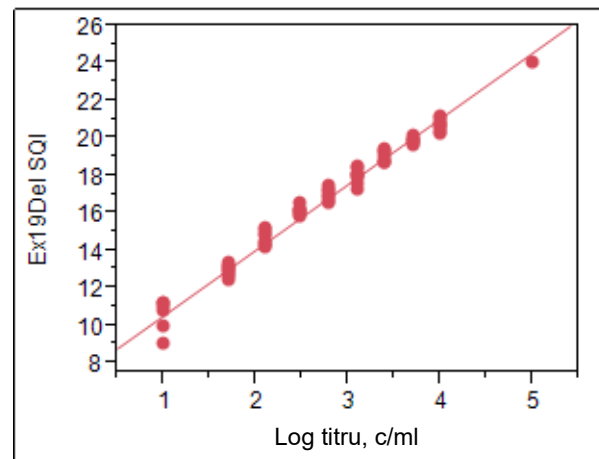
**Obrázek 8** Linearita mutantní DNA ve vzorcích K2 EDTA plazmy: DNA buněčné linie G719A



$$\text{SQI} = -0,987 + 2,986 \times \log \text{ kopií na ml}$$

$$R^2 = 0,968$$

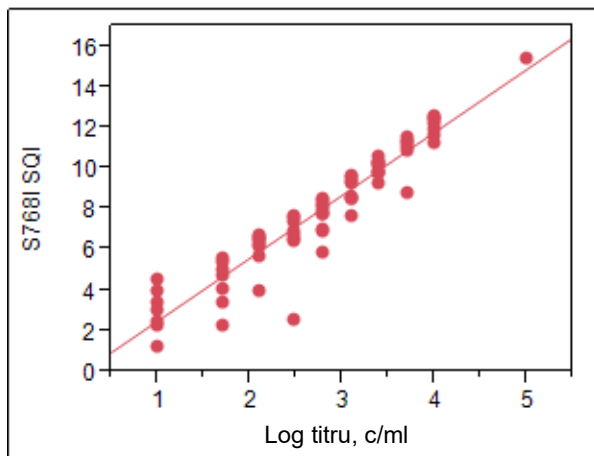
**Obrázek 9** Linearita mutantní DNA ve vzorcích K2 EDTA plazmy: DNA buněčné linie s delecí v exonu 19



$$\text{SQI} = 7,042 + 3,507 \times \log \text{ kopií na ml}$$

$$R^2 = 0,981$$

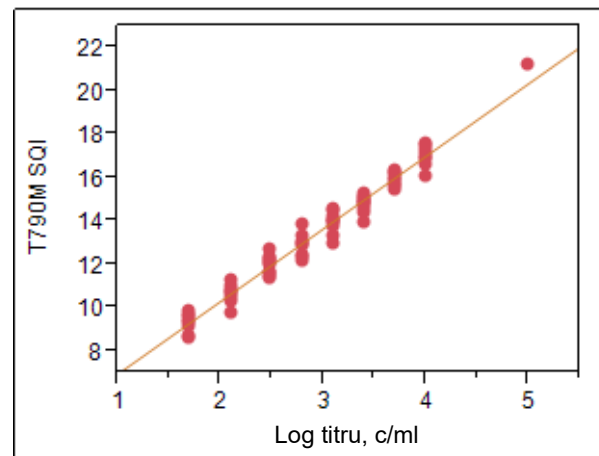
**Obrázek 10** Linearita mutantní DNA ve vzorcích K2 EDTA plazmy: DNA buněčné linie S768I



$$\text{SQI} = -0,578 + 3,093 \times \log \text{ kopií na ml}$$

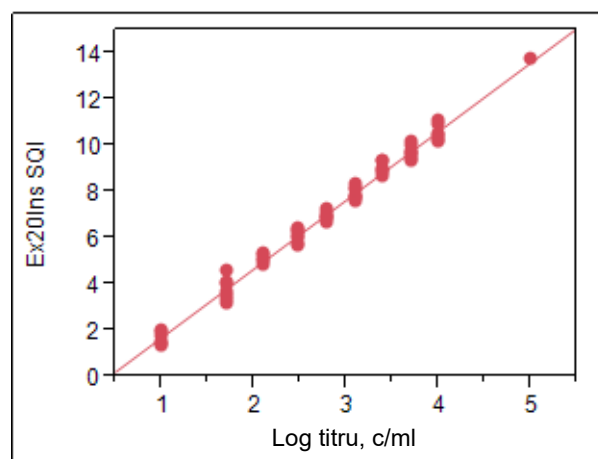
$$R^2 = 0,912$$

**Obrázek 11** Linearita mutantní DNA ve vzorcích K2 EDTA plazmy: DNA buněčné linie T790M



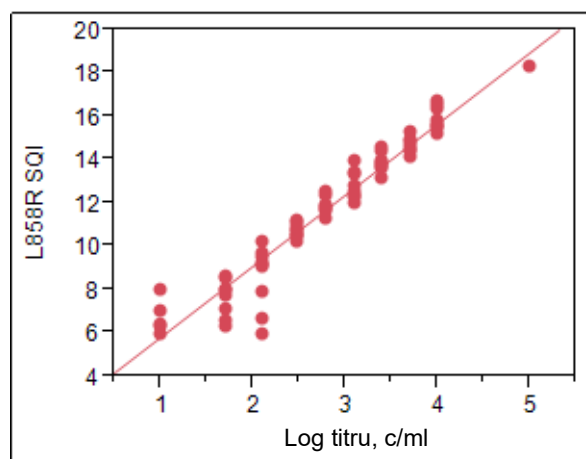
$$\text{SQI} = 3,593 + 3,352 \times \log \text{ kopií na ml}$$

$$R^2 = 0,973$$

**Obrázek 12** Linearita mutantní DNA ve vzorcích K2 EDTA plazmy: DNA buněčné linie Ex20Ins

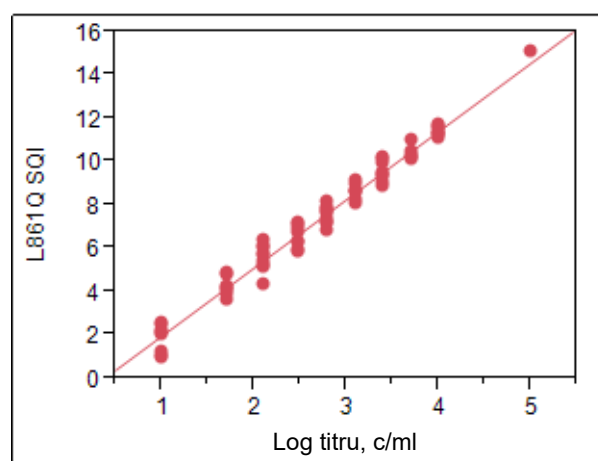
$$\text{SQI} = -1,268 + 2,973 \times \log \text{ kopií na ml}$$

$$R^2 = 0,990$$

**Obrázek 13** Linearita mutantní DNA ve vzorcích K2 EDTA plazmy: DNA buněčné linie L858R

$$\text{SQI} = 2,543 + 3,283 \times \log \text{ kopií na ml}$$

$$R^2 = 0,933$$

**Obrázek 14** Linearita mutantní DNA ve vzorcích K2 EDTA plazmy: DNA z buněčné linie L861Q

$$\text{SQI} = -1,177 + 3,149 \times \log \text{ kopií na ml}$$

$$R^2 = 0,980$$

### Plazma Roche cfDNA

Lineární rozmezí u plazmy Roche cfDNA bylo ověřeno se sériemi ředění zahrnujícími nejméně 6 členů panelu v celém lineárním rozmezí stanoveném pomocí vzorků plazmy K2 EDTA (Tabulka 26). Členy panelu byly připraveny naředěním fragmentované DNA z buněčné linie obsahující každou z převládajících mutací do vzorků plazmy Roche cfDNA zdravého dárce s genem EGFR divokého typu. Hodnocení bylo provedeno v souladu s pokyny CLSI EP06-A.<sup>24</sup> Byly testovány čtyři replikáty každého člena panelu s použitím 2 šarží sad s koncentracemi až 1,0E+04 kopií/ml (celkem 8 replikátů na každou hladinu). Nad 1,0E+04 kopií/ml byly testovány 2 replikáty na šarži (celkem 4 replikáty na každou hladinu).

## Opakovatelnost

Opakovatelnost testu **cobas** EGFR byla vyhodnocena pomocí panelu se dvanácti vzorky obsahujícími ředění DNA z buněčné linie s mutantním genem EGFR ve vzorcích plazmy s K2 EDTA zdravého dárce. Převládající mutace každé třídy podle testu byly spoluzředy do jedenácti vzorků a vyhodnoceny při  $3 \times \text{LoD}$  každé mutace (v kopiích/ml),  $1,0\text{E}+03$  kopií/ml, a  $5,0\text{E}+04$  kopií/ml. Navíc byl testován jeden vzorek divokého typu. Každý z těchto dvanácti vzorků byl testován v duplikátu dvěma pracovníky pomocí dvou různých šarží činidel na dvou analyzátořích **cobas**® z 480 v průběhu 4 dní ( $N = 32$  na vzorek). Test **cobas** EGFR měl míru správnosti 99,2 % (381/384).

Tab. 27 uvádí průměr SQI a SD SQI ze studie opakovatelnosti. Všech 32 replikátů vzorku divokého typu vykázalo očekávaný výsledek „No Mutation Detected“.

**Tab. 27 Průměr SQI a SD SQI ze studie opakovatelnosti**

| Exon EGFR          | Mutace EGFR | Cílová sekvence nukleové kyseliny | Koncentrace (kopií/ml) | Průměr SQI | SD SQI (n = 32) |
|--------------------|-------------|-----------------------------------|------------------------|------------|-----------------|
| 18                 | G719A       | 2156G>C                           | 3,00E+02               | 4,53       | 0,41            |
|                    |             |                                   | 1,00E+03               | 6,86       | 0,38            |
|                    |             |                                   | 5,00E+04               | 11,81      | 0,67            |
| 19                 | Ex19Del     | 2235_2249del15                    | 7,50E+01               | 13,42      | 0,46            |
|                    |             |                                   | 1,00E+03               | 16,85      | 0,42            |
|                    |             |                                   | 5,00E+04               | 22,31      | 0,55            |
| 20                 | S768I       | 2303G>T                           | 6,00E+01               | 5,99       | 0,45            |
|                    |             |                                   | 1,00E+03               | 8,49       | 0,43            |
|                    |             |                                   | 5,00E+04               | 14,13      | 0,43            |
| 20                 | T790M       | 2369C>T                           | 7,50E+01               | 9,00       | 1,03            |
|                    |             |                                   | 1,00E+03               | 13,28      | 0,43            |
|                    |             |                                   | 5,00E+04               | 19,52      | 0,57            |
| 20                 | Ex20Ins     | 2307_2308ins9GCCAGCGTG            | 2,40E+02               | 4,92       | 0,43            |
|                    |             |                                   | 1,00E+03               | 6,77       | 0,40            |
|                    |             |                                   | 5,00E+04               | 12,61      | 0,60            |
| 21                 | L858R       | 2573T>G                           | 1,20E+02               | 9,81       | 0,47            |
|                    |             |                                   | 1,00E+03               | 12,91      | 0,28            |
|                    |             |                                   | 5,00E+04               | 17,21      | 0,81            |
| 21                 | L861Q       | 2582T>A                           | 4,50E+01               | 3,58       | 0,73            |
|                    |             |                                   | 1,00E+03               | 7,91       | 0,45            |
|                    |             |                                   | 5,00E+04               | 10,06      | 0,60            |
| EGFR divokého typu |             |                                   | 0                      | NMD        | NMD             |

NMD = No Mutation Detected

# Hodnocení klinických výsledků

## Klinická reprodukovatelnost u plazmy K2 EDTA

Reprodukovatelnost testu **cobas** EGFR byla stanovena pomocí studie na 3 testovacích pracovištích (2 externí a 1 interní, 2 pracovníci na každém pracovišti), 3 šarží činidel a v 3 testovacích dnech nejdoucích po sobě. Použit byl 9členný panel uměle vytvořených vzorků buněčné linie DNA zředěné v plazmě NSCLC. Mutace, včetně jedné mutace G719X v exonu 18, jedné deleční mutace v exonu 19, dvou mutací T790M v exonu 20, jedné inzerční mutace v exonu 20, jedné mutace L858R v exonu 21 a jedné mutace L861Q v exonu 21, byly zastoupeny ve čtyřech uměle vytvořených vzorcích – souhrn viz Tab. 28. Každý uměle vytvořený vzorek byl připraven při dvou hladinách: cca 100 kopií/ml a 300 kopií/ml. Tyto uměle vytvořené vzorky byly zařazeny do osmi samostatných členů panelu společně s kontrolou divokého typu, aby se vytvořil panel s devíti členy.

**Tab. 28 Kombinace mutací u uměle vytvořených vzorků**

| Buněčná linie DNA – kombinace 1 | Buněčná linie DNA – kombinace 2 | Buněčná linie DNA – kombinace 3 | Buněčná linie DNA – kombinace 4 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Exon 19 del                     | L858R                           | S768I                           | L861Q                           |
| T790M                           | T790M                           | G719A                           | Exon 20 inz                     |

Celkem bylo provedeno 37 cyklů s 36 platnými cykly a jedním neplatným cyklem. Celkem bylo testováno 648 panelů (nebo 1224 mutací), z nichž 646 panelů (nebo 1220 mutací) mělo platné výsledky. Mezi 72 platnými testy člena panelu divokého typu nebyly žádné výsledky „Mutation Detected“, což je 100% shoda. Shody se lišily podle členů s mutací: u osmi byla dosažena 100% shoda, u pěti > 97% a jedna mutace (G719X) prokázala nižší shodu, přibližně 90%. Výsledky dle celkové shody podle mutací viz Tab. 29. Variační koeficient (CV) byl ≤ 12,8 % u všech členů panelu s mutací. Pro interní kontroly a kontroly mutací byl celkový CV ≤ 1,5 %. CV mezi šaržemi byl ≤ 0,89 % a ≤ 1,47 % v rámci šarže.

Tab. 29 Celkové odhady shody podle členů panelu s mutací ve studii reprodukovatelnosti

| Člen s mutací                                     | Počet platných testů | Shoda N | Shoda % (95% CI) <sup>a</sup>  |
|---------------------------------------------------|----------------------|---------|--------------------------------|
| Divoký typ – NA                                   | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |
| Exon 18 G719A – 100 kopií/ml                      | 72                   | 65      | 90,3 (81,0, 96,0) <sup>b</sup> |
| Delece v exonu 19 (2235_2249del15) – 100 kopií/ml | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |
| Inzerce v exonu 20 (2307_2308ins9) – 100 kopií/ml | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |
| Exon 20 S768I – 100 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |
| Exon 20 T790M – 100 kopií/ml                      | 143                  | 139     | 97,2 (93,0, 99,2)              |
| Exon 21 L858R – 100 kopií/ml                      | 71                   | 70      | 98,6 (92,4, 100,0)             |
| Exon 21 L861Q – 100 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |
| Exon 18 G719A – 300 kopií/ml                      | 71                   | 70      | 98,6 (92,4, 100,0)             |
| Delece v exonu 19 (2235_2249del15) – 300 kopií/ml | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |
| Inzerce v exonu 20 (2307_2308ins9) – 300 kopií/ml | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |
| Exon 20 S768I – 300 kopií/ml                      | 71                   | 71      | 100 (94,9, 100,0)              |
| Exon 20 T790M – 300 kopií/ml                      | 144                  | 142     | 98,6 (95,1, 99,8)              |
| Exon 21 L858R – 300 kopií/ml                      | 72                   | 71      | 98,6 (92,5, 100,0)             |
| Exon 21 L861Q – 300 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)              |

<sup>a</sup> 95% CI = exaktní 95% binomický interval spolehlivosti.

<sup>b</sup> Nižší shoda pro tento vzorek byla způsobena primárně více chybějícími stanoveními (n = 6/24 kombinovaných replikátů), k nimž došlo primárně na jednom ze tří pracovišť.

Pozn.: výsledky se shodovaly, když člen panelu s mutací měl platný výsledek „Mutation Detected“ nebo když člen panelu divokého typu měl platný výsledek „No Mutation Detected“.

Pozn.: vzorky použitých této studii se skládaly z DNA z buněčné linie mechanicky fragmentované na průměrnou velikost 220 bp a měly na pozadí DNA WT přibližně 12 000 kopií/ml.

## Klinická reprodukovatelnost u plazmy Roche cfDNA

Reprodukovatelnost testu **cobas** EGFR byla stanovena pomocí studie na 3 testovacích pracovištích (2 externí a 1 interní, 2 pracovníci na každém pracovišti), jedna šarže činidel a v 3 testovacích dnech nejdoucích po sobě. Použity byly tři 9členné panely uměle vytvořených vzorků buněčné linie DNA zředěné ve třech jedinečných směsích plazmy zdravých dárců. Vzorky v každé směsi byly odebrány pomocí jedinečné šarže zkumavek Roche cfDNA. Na každém pracovišti byly otestovány dva plazmové panely. Mutace, včetně jedné mutace G719X v exonu 18, jedné deleční mutace v exonu 19, jedné mutace T790M v exonu 20, jedné inzerční mutace v exonu 20, jedné mutace L858R v exonu 21 a jedné mutace L861Q v exonu 21, byly zastoupeny ve čtyřech uměle vytvořených vzorcích – souhrn viz Tab. 30. Každý uměle vytvořený vzorek byl připraven při dvou hladinách: cca 100 kopií/ml a 300 kopií/ml. Tyto uměle vytvořené vzorky byly zařazeny do osmi samostatných členů panelu společně s kontrolou divokého typu, aby se vytvořil panel s devíti členy.

Tab. 30 Kombinace mutací u uměle vytvořených vzorků

| Buněčná linie DNA – kombinace 1 | Buněčná linie DNA – kombinace 2 | Buněčná linie DNA – kombinace 3 | Buněčná linie DNA – kombinace 4 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Exon 19 del                     | S768I                           | T790M                           | L858R                           |
| Exon 20 inz                     | G719A                           | L861Q                           | n/a                             |

Celkově bylo provedeno 36 cyklů a všechny cykly byly platné. Celkem bylo testováno 648 panelů, z nichž 646 panelů (nebo 1220 mutací) mělo platné výsledky. Mezi 72 platnými testy člena panelu divokého typu byl jeden výsledek „Mutation Detected“, což je 98,6% shoda. Shoda se liší u členů s mutací: u třinácti byla 100% shoda a u jednoho > 98%. Výsledky dle celkové shody podle mutací viz Tab. 31. Variační koeficient (CV) byl  $\leq 13,7\%$  u všech členů panelu s mutací. Pro interní kontroly a kontroly mutací byl celkový CV  $\leq 1,3\%$ .

**Tab. 31 Celkové odhady shody podle členů panelu s mutací ve studii reprodukovatelnosti**

| Člen s mutací                                     | Počet platných testů | Shoda N | Shoda % (95% CI) <sup>a</sup> |
|---------------------------------------------------|----------------------|---------|-------------------------------|
| Divoký typ – NA                                   | 72                   | 71      | 98,6 (92,5, 100,0)            |
| Exon 18 G719A – 100 kopií/ml                      | 72                   | 71      | 98,6 (92,5, 100,0)            |
| Delece v exonu 19 (2235_2249del15) – 100 kopií/ml | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Inzerce v exonu 20 (2307_2308ins9) – 100 kopií/ml | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Exon 20 S768I – 100 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Exon 20 T790M – 100 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Exon 21 L858R – 100 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Exon 21 L861Q – 100 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Exon 18 G719A – 300 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Delece v exonu 19 (2235_2249del15) – 300 kopií/ml | 71                   | 71      | 100 (94,9, 100,0)             |
| Inzerce v exonu 20 (2307_2308ins9) – 300 kopií/ml | 71                   | 71      | 100 (94,9, 100,0)             |
| Exon 20 S768I – 300 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Exon 20 T790M – 300 kopií/ml                      | 71                   | 71      | 100 (94,9, 100,0)             |
| Exon 21 L858R – 300 kopií/ml                      | 72                   | 72      | 100 (95,0, 100,0)             |
| Exon 21 L861Q – 300 kopií/ml                      | 71                   | 71      | 100 (94,9, 100,0)             |

<sup>a</sup> 95% CI = exaktní 95% binomický interval spolehlivosti.

Pozn.: Výsledky se shodovaly, když člen panelu s mutací měl platný výsledek „Mutation Detected“ nebo když člen panelu divokého typu měl platný výsledek „No Mutation Detected“.

## Mez detekce (LoD) s použitím vzorků plazmy NSCLC

K potvrzení LoD se vzorky plazmy K2 EDTA NSCLC u tří delecí v exonu 19, jedné mutace L858R a jedné mutace T790M byla provedena studie pomocí testu **cobas** EGFR na třech testovacích pracovištích (dvou externích a jednom interním pracovišti, se dvěma pracovníky na každém pracovišti), s použitím tří šarží činidel a ve dvou testovacích dnech nejdoucích po sobě. Byl použit panel vzorků plazmy NSCLC s 11 členy (pět mutací, každá ve dvou hladinách:  $1 \times \text{LoD}$  a  $2 \times \text{LoD}$ ; plus WT). Celkem bylo provedeno 12 cyklů (dva replikáty na cyklus) a všechny cykly byly platné. Celkem bylo provedeno 264 testů s 11 členy panelu, z nichž bylo 262 (99,2 %) testů platných. Mezi 23 platnými testy členů panelu divokého typu nebyl pozorován výsledek „Mutation Detected“, což je 100% shoda. Procentní shoda pro exon 20 T790M –  $1 \times \text{LoD}$  je 95,8 %; a 100% pro všechny další členy panelu s mutací. Shrnutí odhadů shody podle členů panelu viz Tab. 32. Variační koeficient (CV) byl  $< 7,0\%$  u všech členů panelu s mutací.

Tab. 32 Odhady shody podle členů panelu

| Položka panelu              | Počet platných testů | Shoda N | Shoda % (95% CI) <sup>a</sup> |
|-----------------------------|----------------------|---------|-------------------------------|
| Divoký typ – NA             | 23                   | 23      | 100 (85,2, 100,0)             |
| Exon 19, delece 1 – 1 × LoD | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |
| Exon 19, delece 1 – 2 × LoD | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |
| Exon 19, delece 2 – 1 × LoD | 23                   | 23      | 100 (85,2, 100,0)             |
| Exon 19, delece 2 – 2 × LoD | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |
| Exon 19, delece 3 – 1 × LoD | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |
| Exon 19, delece 3 – 2 × LoD | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |
| Exon 20 T790M – 1 × LoD     | 24                   | 23      | 95,8 (78,9, 99,9)             |
| Exon 20 T790M – 2 × LoD     | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |
| Exon 21 L858R – 1 × LoD     | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |
| Exon 21 L858R – 2 × LoD     | 24                   | 24      | 100 (85,8, 100,0)             |

<sup>a</sup> 95% CI = exaktní 95% binomický interval spolehlivosti.

Pozn.: výsledky jsou uvedeny jako shoda, pokud měl platný test člena panelu s mutací výsledek „Mutation Detected“ nebo pokud měl platný test člena panelu divokého typu výsledek „No Mutation Detected“.

Pozn.: klinické vzorky použité v této studii měly WT DNA pozadí přibližně 24 000 kopií/ml.

## Korelace plazmy Roche cfDNA s plazmou K2 EDTA

Účinnost testu **cobas** EGFR s plazmou K2 EDTA a plazmou Roche cfDNA byla porovnána testováním panelu vzorků, který obsahoval párované odběry od 34 pacientů s NSCLC a genem EGFR divokého typu, 17 pacientů s NSCLC pozitivních na mutaci EGFR a 20 zdravých dárců. Odběry od zdravých dárců byly použity k přípravě zástupných vzorků sestávajících z fragmentované DNA z buněčné linie obsahující převládající mutace identifikované testem **cobas** EGFR, přidané do plné krve odebrané do zkumavek K2 EDTA a Roche cfDNA. Hladina přidané fragmentované DNA buněčné linie v zástupných vzorcích byla přibližně 1,5 × LoD pro každou mutaci, jak bylo zjištěno u plazmy K2 EDTA (Tab. 24). Stav mutace byl u každého pacienta s NSCLC potvrzen metodou NGS. Každý vzorek byl testován jednou šarží činidel testu **cobas** EGFR. Všechny vzorky vykazaly platné výsledky; výsledky srovnání uvádí Tab. 33.

Tab. 33 Analýza shody mezi plazmou K2 EDTA a plazmou získanou ze zkumavky Roche cfDNA

|                              |        | Zkumavka K2 EDTA |           | Celkem    |
|------------------------------|--------|------------------|-----------|-----------|
|                              |        | MD               | NMD       |           |
| Zkumavka Roche Cell-Free DNA | MD     | 37               | 0         | <b>37</b> |
|                              | NMD    | 0                | 34        | <b>34</b> |
|                              | Celkem | <b>37</b>        | <b>34</b> | <b>71</b> |

|                                  |                     |
|----------------------------------|---------------------|
| Shoda pozitivních (%):<br>95% CI | 100 %<br>90,5–100 % |
| Shoda negativních (%):<br>95% CI | 100 %<br>89,7–100 % |
| Celková shoda (%):<br>95% CI     | 100 %<br>94,5–100 % |

Kde: MD = výsledek „Mutation Detected“ a NMD = výsledek „No Mutation Detected“

Shoda mezi spárovanými vzorky pro plazmu K2 EDTA a plazmu získanou z odběrových zkumavek Roche Cell-Free DNA byla 100 %. Nebyly pozorovány žádné protichůdné výsledky.

Ve vzorcích plazmy ze studie test **cobas** EGFR detekoval následující mutace v exonu 18, 19, 20 a 21 genu EGFR – viz Tab. 34. Pokud není uvedeno jinak, mutace byly pozorovány u vzorků NSCLC.

**Tab. 34 Mutace pozorované u korelace plazmy Roche cfDNA s plazmou K2 EDTA**

| Exon | Sekvence mutace                     | Změna aminokyselin | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| 18   | 2156G>C*                            | G719A              | 6239                    |
|      | 2155G>A§                            | G719S              | 6252                    |
| 19   | 2235_2249del15 <sup>+</sup>         | E746_A750delELREA  | 6223                    |
|      | 2236_2250del15§                     | E746_A750delELREA  | 6225                    |
|      | 2219_2236dup<br>TTCCCGTCGCTATCAAGG§ | K745_E746insVPVAIK | 6963938                 |
|      | 2237_2248del12§                     | E746_E749delELRE   | Nenalezeno              |
|      | 2237_2251del15§                     | E746_T751>A        | 12678                   |
|      | 2239_2240TT>CC§                     | L747P              | 24267                   |
|      | 2251A>C§                            | T751P              | Nenalezeno              |
| 20   | 2369C>T*                            | T790M              | 6240                    |
|      | 2303G>T*                            | S768I              | 6241                    |
|      | 2307_2308insGCCAGCGTG*              | V769_D770insASV    | 12376                   |
| 21   | 2573T>G*                            | L858R              | 6224                    |
|      | 2582T>A*                            | L861Q              | 6213                    |

\* Pozorována pouze v zástupném vzorku

+ Pozorována v zástupném vzorku a vzorku NSCLC

§ Pozorována pouze ve vzorku NSCLC

## Korelace s referenční metodou s použitím vzorků plazmy fáze III z kohorty ASPIRATION

Analytická přesnost testu **cobas** EGFR při detekci delece v exonu 19 a mutací L858R byla posouzena srovnáním s validovanou platformou sekvenování nové generace (NGS) s použitím vzorků K2 EDTA plazmy od pacientů s pokročilým NSCLC z jedné nebo více následujících studií (kohorta ASPIRATION): Klinické studie společnosti Genentech G027821 (MetMab) a G027761 (MetLung) spolu s klinickou studií společnosti Roche ML25637 (ASPIRATION).

Sto dvacet osm vzorků plazmy o objemu 2 ml a s platnými spárovanými výsledky testu **cobas** EGFR v plazmě i metody NGS s použitím vzorků plazmy bylo zahrnuto do analýzy shody pro deleci v exonu 19 EGFR nebo mutace L858R. Celkem 32 vzorků mělo výsledky MD a 95 NMD dle metody NGS. Parametr PPA mezi testem **cobas** EGFR v plazmě a NGS v plazmě činil 87,5 % (95% CI: 71,9 %, 95,0 %); NPA mezi testem **cobas** EGFR a NGS byl 96,8 % (95% CI: 91,1 %, 98,9 %), viz Tab. 35.

**Tab. 35 Srovnání testu cobas EGFR v plazmě s NGS při detekci delece v exonu 19 EGFR nebo mutací L858R**

| Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 87,5 % (28/32)      | 71,9 %, 95,0 % |
| Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 96,8 % (92/95)      | 91,1 %, 98,9 % |

## Korelace mezi vzorky plazmy a tkáně použité v testu cobas EGFR pro detekci delece v exonu 19 a mutací L858R s použitím vzorků ze studie ENSURE fáze III

Studie ENSURE (YO25121) byla multicentrická otevřená randomizovaná studie fáze III k vyhodnocení účinnosti a bezpečnosti přípravku TARCEVA® (erlotinib) ve srovnání s gemcitabinem/cisplatinou jako léčby první linie pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) ve stádiu IIIB/IV s delecí v exonu 19 nebo mutací L858R v tyrozin-kinázové oblasti receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) v nádorech. Screening podstoupilo celkem 647 pacientů, 601 pacientů mělo platný výsledek EGFR z tkáně na delecí v exonu 19 a mutaci L858R při testu cobas EGFR a 217 pacientů bylo randomizováno ve studii.

Pět set sedmnáct pacientů (86,0 %, 517/601) mělo odpovídající vzorky plazmy K2 EDTA a tkáně a 441 pacientů mělo objem vzorku plazmy  $\geq 2,0$  ml, tj. objem vzorku, pro nějž byl test cobas EGFR v plazmě validován.

Korelace vzorků plazmy a tkáně podle testu cobas EGFR k detekci delece v exonu 19 a mutace L858R byla vyhodnocena samostatně i celkově. Do analýzy shody bylo zahrnuto celkem 431 vzorků se spárovanými platnými výsledky vzorků tkáně i plazmy v testu cobas EGFR. Procento shody pozitivních vzorků (PPA) mezi vzorky plazmy a tkáně bylo 76,7 % (95% CI: 70,5 % až 81,9 %), procento shody negativních vzorků (NPA) bylo 98,2 % (95% CI: 95,4 % až 99,3 %) při detekci delece v exonu 19 a mutace L858R celkově – viz Tab. 36. Parametry PPA, NPA a OPA při detekci delece v exonu 19 a mutace L858R samostatně – také viz Tab. 36.

**Tab. 36 Shoda mezi vzorky plazmy a tkáně použité v testu cobas EGFR při detekci delece v exonu 19 a mutace L858R**

| Mutace         | Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|----------------|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Celkově        | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 76,7 % (161/210)    | 70,5 %, 81,9 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 98,2 % (217/221)    | 95,4 %, 99,3 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 87,7 % (378/431)    | 84,2 %, 90,5 % |
| Exon 19 delece | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 80,8 % (97/120)     | 72,9 %, 86,9 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 98,7 % (307/311)    | 96,7 %, 99,5 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 93,7 % (404/431)    | 91,0 %, 95,7 % |
| L858R          | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 67,8 % (61/90)      | 57,6 %, 76,5 % |
|                | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 99,1 % (338/341)    | 97,4 %, 99,7 % |
|                | Celková procentní shoda (OPA)            | 92,6 % (399/431)    | 89,7 %, 94,7 % |

Pozn.: parametry PPA a NPA byly vypočteny s použitím tkáně jako reference.

Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) a negativní prediktivní hodnota (NPV) pro detekci delece v exonu 19 a mutací L858R celkově byly také vypočítány s použitím bootstrap metody na základě rozdílné prevalence mutace v tkáních různých populací (Tab. 37). Dle očekávání se PPV zvyšuje a NPV snižuje s rostoucí prevalencí mutace EGFR. U bělošské populace pacientů, u které se předpokládá 10–15 % prevalence mutace EGFR v tkáni, se PPV pohybuje v rozmezí od 82,8 % do 88,6 %, zatímco NPV se pohybuje v rozmezí od 96,0 % do 97,4 %. PPV se pohybuje v rozmezí od 94,8 % do 97,8 %, zatímco NPV v rozmezí od 80,8 % do 90,9 %, pokud jsou stanoveny na základě prevalence v populaci asiátů, s předpokládanou 30–50% prevalencí mutace EGFR ve tkáni.

**Tab. 37 Odhadované prediktivní hodnoty testu cobas EGFR ve tkáni a testu cobas EGFR v plazmě (pacienti s objemem vzorků plazmy  $\geq 2,0$  ml) na základě různé prevalence mutace EGFR ve tkáni**

| Předpokládaná prevalence EGFR na základě vzorků tkáně | Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) | Negativní prediktivní hodnota (NPV) |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 10 %                                                  | 82,8 % (71,3 %, 93,7 %)             | 97,4 % (96,2 %, 98,7 %)             |
| 15 %                                                  | 88,6 % (79,7 %, 96,9 %)             | 96,0 % (94,3 %, 97,6 %)             |
| 20 %                                                  | 91,6 % (85,0 %, 97,8 %)             | 94,4 % (92,3 %, 96,3 %)             |
| 30 %                                                  | 94,8 % (90,0 %, 98,6 %)             | 90,9 % (88,4 %, 93,4 %)             |
| 40 %                                                  | 96,8 % (93,0 %, 99,4 %)             | 86,4 % (83,3 %, 89,4 %)             |
| 50 %                                                  | 97,8 % (95,0 %, 100,0 %)            | 80,8 % (77,4 %, 84,8 %)             |

Pozn.: 95% CI byly vypočteny pomocí bootstrap metody.

Pozn.: výsledky 79 vzorků s objemem  $< 2,0$  ml byly při analýze považovány za neplatné.

Pozn.: PPV a NPV byly vypočteny s použitím plazmy jako reference.

## Korelace s referenční metodou s použitím vzorků fáze II z klinického hodnocení AURA2

Klinické výsledky testu **cobas** EGFR byly vyhodnoceny porovnáním s validovanou platformou sekvenování nové generace (NGS) s použitím vzorků plazmy K2 EDTA od pacientů s pokročilým NSCLC, kteří se podrobili screeningu ve fázi II klinického hodnocení AURA2 zkoumajícího přípravek TAGRISSO®.<sup>23</sup>

Z 383 způsobilých pacientů mělo 344 pacientů k dispozici vzorky plazmy a podstoupilo testování pomocí testu **cobas** EGFR, s 342 platnými výsledky a dvěma neplatnými výsledky. Z celkem 344 vzorků plazmy testovaných pomocí testu **cobas** EGFR bylo 322 (93,6 %) také testováno pomocí metody NGS a 22 nemělo dostatečný objem plazmy k testování pomocí NGS.

Byla vyhodnocena analytická přesnost testu **cobas** EGFR v porovnání s referenční metodou NGS při detekci mutace T790M ve vzorcích plazmy. Do analýzy shody bylo zařazeno celkem 320 vzorků se spárovanými výsledky testu **cobas** EGFR i testu NGS. Procento shody pozitivních vzorků (PPA) mezi testem **cobas** EGFR a NGS bylo 91,5 % (95% CI: 85,7 % až 95,1 %), procento shody negativních vzorků (NPA) bylo 91,1 % (95% CI: 86,0 % až 94,4 %) při detekci mutace T790M – viz Tab. 38.

**Tab. 38 Srovnání testu cobas EGFR v plazmě s NGS při detekci mutace T790M genu EGFR**

| Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 91,5 % (129/141)    | 85,7 %, 95,1 % |
| Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 91,1 % (163/179)    | 86,0 %, 94,4 % |

Ve vzorcích plazmy K2 EDTA ze studie AURA2 test **cobas** EGFR detekoval mutace v exonu 18, 19, 20 a 21 genu EGFR – viz Tab. 39.

**Tab. 39 Mutace detekované testem cobas EGFR v kohortě AURA2**

| Exon | Sekvence mutace       | Změna aminokyselin   | COSMIC ID <sup>14</sup> |
|------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| 18   | 2156G>C               | G719A                | 6239                    |
|      | 2155G>A               | G719S                | 6252                    |
|      | 2155G>T               | G719C                | 6253                    |
| 19   | 2235_2249del15        | E746_A750delELREA    | 6223                    |
|      | 2236_2250del15        | E746_A750delELREA    | 6225                    |
|      | 2236_2256>ATC         | E746_S752>I          | 133190                  |
|      | 2237_2251del15        | E746_T751>A          | 12678                   |
|      | 2237_2255>T           | E746_S752>V          | 12384                   |
|      | 2237_2258>TATC        | E746_P753>VS         | Nenalezeno              |
|      | 2238_2248>GC          | L747_A750>P          | 12422                   |
|      | 2239_2247delTTAAGAGAA | L747_E749delLRE      | 6218                    |
|      | 2239_2248TTAAGAGAAG>C | L747_A750>P          | 12382                   |
|      | 2239_2251>C           | L747_T751>P          | 12383                   |
|      | 2239_2256>CAG         | L747_S752>Q          | Nenalezeno              |
|      | 2239_2256del18        | L747_S752delLREATS   | 6255                    |
|      | 2239_2258>CA          | L747_P753>Q          | 12387                   |
|      | 2239_2264>GCCAA       | L747_A755>AN         | 85891                   |
|      | 2240_2251del12        | L747_T751>S          | 6210                    |
|      | 2240_2254del15        | L747_T751delLREAT    | 12369                   |
|      | 2240_2257del18        | L747_P753>S          | 12370                   |
|      | 2240_2264>CGAGAGA     | L747_A755>SRD        | Nenalezeno              |
|      | 2253_2276del24        | S752_I759delSPKANKEI | 13556                   |
| 20   | 2369C>T               | T790M                | 6240                    |
|      | 2303G>T               | S768I                | 6241                    |
| 21   | 2573T>G               | L858R                | 6224                    |
|      | 2573_2574TG>GT        | L858R                | 12429                   |
|      | 2582T>A               | L861Q                | 6213                    |

## Korelace mezi vzorky plazmy a tkáně při detekci mutace T790M s použitím vzorků ze studie AURA2 fáze II

Klinické hodnocení AURA2<sup>23</sup> bylo otevřené klinické hodnocení s jedním ramenem fáze II k hodnocení bezpečnosti a účinnosti přípravku TAGRISSO® (osimertinib) jako léčby druhé nebo  $\geq$  třetí linie u pacientů s pokročilým NSCLC, u nichž došlo k progresi po předchozí terapii schváleným přípravkem EGFR TKI a kteří byli T790M-pozitivní při testu **cobas** EGFR. Screening podstoupilo celkem 472 pacientů, 383 pacientů podstoupilo test vzorku tkáně a 371 pacientů mělo platný výsledek testu tkáně EGFR na mutaci T790M při testu **cobas** EGFR. Z těchto bylo 233 pacientů T790M-pozitivních a 210 pacientů bylo randomizováno ve studii.

Z 383 způsobilých pacientů mělo 344 pacientů vzorky K2 EDTA plazmy. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 334 vzorků se spárovanými výsledky vzorků tkáně a plazmy v testu **cobas** EGFR. Procento shody pozitivních vzorků (PPA) mezi vzorky plazmy a tkáně bylo 58,7 % (95% CI: 52,2 %, 65,0 %) a procento shody negativních vzorků (NPA) bylo 80,2 % (95% CI: 71,8 %, 86,5 %) při detekci mutace T790M. Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) byla 85,6 % (95% CI: 79,2 %, 90,3 %) a negativní prediktivní hodnota (NPV) byla 49,2 % (95% CI: 42,0 %, 56,4 %) při detekci mutace T790M – viz Tab. 40.

Hodnoty PPV uvedené v Tab. 40 byly ovlivněny 22 vzorky, které byly T790M-negativní při testu **cobas** EGFR ve tkáni a T790M-pozitivní při testu **cobas** EGFR v plazmě. Osmnáct vzorků bylo potvrzeno jako T790M-pozitivní pomocí NGS v plazmě a jeden vzorek neměl dostatečný objem pro testování NGS. Pouze tři vzorky byly pomocí NGS stanoveny jako T790M-negativní.

**Tab. 40 Shoda mezi vzorky plazmy a tkáně použité v testu cobas EGFR při detekci mutace T790M**

| Mutace | Míra shody                               | Procentní shoda (N) | 95% CI         |
|--------|------------------------------------------|---------------------|----------------|
| T790M  | Procentní shoda pozitivních vzorků (PPA) | 58,7 % (131/223)    | 52,2 %, 65,0 % |
|        | Procentní shoda negativních vzorků (NPA) | 80,2 % (89/111)     | 71,8 %, 86,5 % |
|        | Celková procentní shoda (OPA)            | 65,9 % (220/334)    | 60,6 %, 70,8 % |
|        | Pozitivní prediktivní hodnota (PPV)      | 85,6 % (131/153)    | 79,2 %, 90,3 % |
|        | Negativní prediktivní hodnota (NPV)      | 49,2 % (89/181)     | 42,0 %, 56,4 % |

Pozn.: parametry PPA a NPA byly vypočteny s použitím tkáně jako reference.

Pozn.: PPV a NPV byly vypočteny s použitím plazmy jako reference.

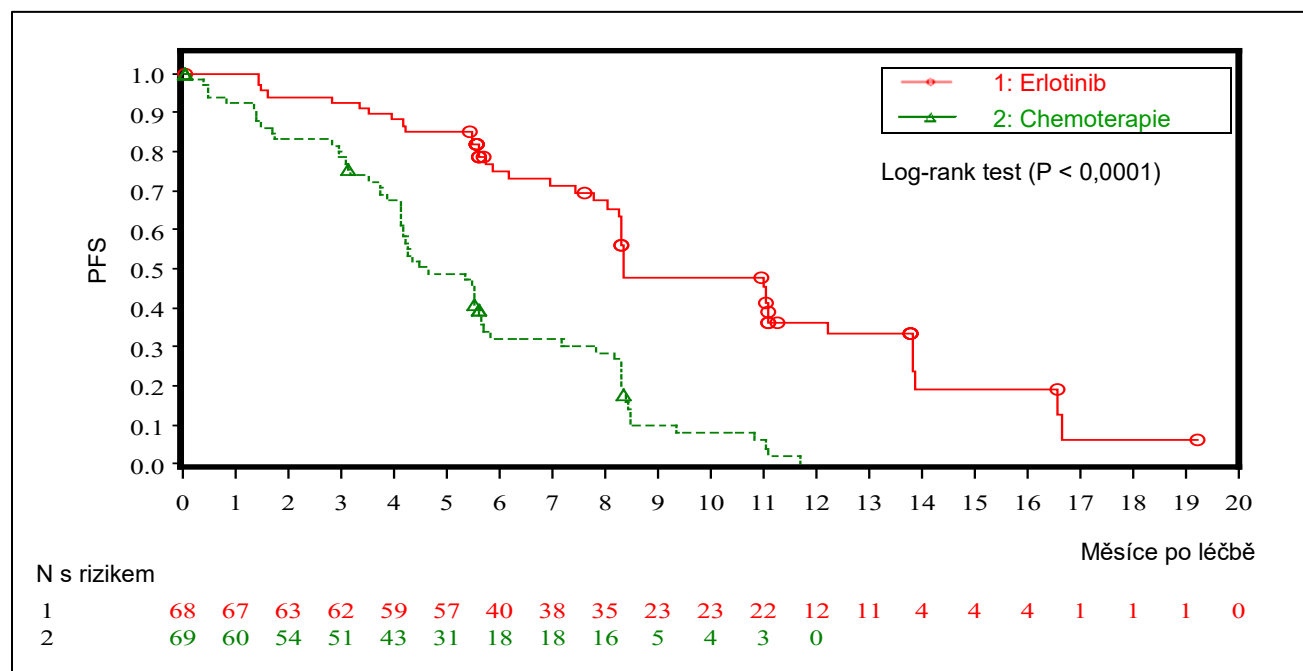
Shoda mezi vzorky plazmy a tkáně při detekci rezistenční mutace T790M je nižší než u aktivačních mutací. Hodnota PPA může být ovlivněna heterogenitou tkáně: na rozdíl od aktivačních mutací L858R a delecí v exonu 19 může být mutace T790M přítomna v malém procentu nádorových buněk, protože se obecně jedná o získanou mutaci; proto T790M cfDNA může být přítomna v plazmě pouze ve velmi nízké koncentraci a pod mezí detekce. Hodnota NPA může být také ovlivněna heterogenitou nádoru: vzhledem k tomu, že mutace T790M nemusí být přítomna ve všech nádorových buňkách, může být biopsie tkáně provedena v části nádoru, kde se mutace T790M nevyskytuje, zatímco jiné části nádoru mohou být T790M-pozitivní.<sup>7</sup>

## Výsledné klinické údaje

### ENSURE

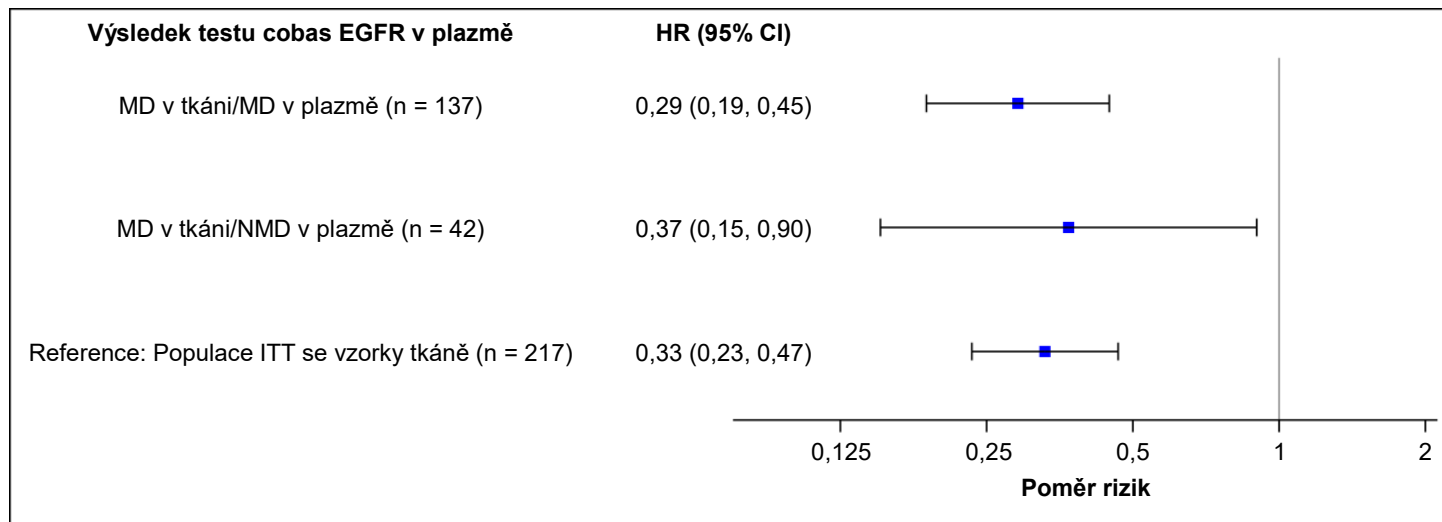
Ve studii ENSURE z 217 zařazených pacientů (tj. těch, u nichž byla detekována delece v exonu 19 nebo mutace L858R ve vzorku tkáně pomocí testu **cobas** EGFR v1) mělo 214 (98,6 %) k dispozici vzorek K2 EDTA plazmy a 180 pacientů mělo objem vzorku plazmy 2,0 ml. Ze 180 vzorků plazmy s objemem 2 ml testovaných pomocí testu **cobas** EGFR mělo 137 výsledek „Mutation Detected“ pro deleci v exonu 19 nebo mutaci L858R (68 pacientů v rameni s přípravkem TARCEVA®, 69 pacientů v rameni s chemoterapií), 42 mělo výsledek „No Mutation Detected“ (22 pacienti v rameni s erlotinibem, 20 pacientů v rameni s chemoterapií) a jeden vzorek poskytl neplatný výsledek. Kaplanovy-Meierovy křivky pro PFS vyhodnocené zkoušejícím jsou uvedeny na Obrázek 15 pro pacienty s delecí v exonu 19 nebo mutací L858R ve vzorku plazmy. Pacienti v rameni s přípravkem TARCEVA® měli delší PFS v porovnání s pacienty v rameni s chemoterapií a tyto dvě křivky byly dobře odděleny v průběhu observačního období (p hodnota < 0,001). To ukazuje na významný přínos léčby přípravkem TARCEVA® u pacientů s detekovatelnou aktivační mutací genu EGFR v plazmě.

**Obrázek 15** Kaplanův-Meierův graf doby přežití bez progresu podle léčby pro pacienty s mutací detekovanou testem cobas EGFR u vzorků plazmy i tkáně (vyhodnocení zkoušejícím) (se vzorky plazmy o objemu 2 ml)



Konzistentní přínos v PFS byl pozorován u všech pacientů, kteří měli pozitivní mutaci genu EGFR ve tkáni a vzorky plazmy o objemu 2,0 ml bez ohledu na to, zda měli pozitivní či negativní výsledek na mutaci v plazmě, a tento přínos byl podobný přínosu PFS pozorovanému v celkové populaci ENSURE ITT (HR = 0,33; 95% CI: 0,23, 0,47) – viz Obrázek 16 níže.

**Obrázek 16** Forestův graf HR u PFS podle vyhodnocení zkoušejícím (se vzorky plazmy o objemu 2 ml)



Pozn.: MD = Mutation Detected (delece v exonu 19 nebo L858R); NMD = No Mutation Detected (delece v exonu 19 a L858R)

## AURA2

Primárním cílovým parametrem účinnosti byla objektivní míra odpovědi (ORR) dle kritérií RECIST 1.1 na základě zaslepeného nezávislého centrálního vyhodnocení (BICR) s použitím hodnotitelných výsledků pro soubor k analýze odpovědi. Parametr ORR byl definován jako počet (%) pacientů s alespoň jednou návštěvou a výsledkem úplná odpověď (CR) nebo částečná odpověď (PR), která byla potvrzena nejméně čtyři týdny poté (tj. nejlepší objektivní odpověď [BOR] CR nebo PR).

V populaci souboru pro analýzu pro tkáň pacientů s vyhodnotitelnou odpovědí (ERAS) (T790M-pozitivní pacienti zjištění pomocí testu **cobas** EGFR ve tkáni, kteří obdrželi alespoň jednu dávku přípravku TAGRISSO® a měli měřitelné onemocnění při vstupu do studie dle BICR) mělo 111 pacientů T790M-pozitivní K2 EDTA plazmu podle testu **cobas** EGFR (tj. byli T790M-pozitivní podle vzorků tkáně i plazmy). Parametr ORR pro tuto podskupinu byl 64,9 % (72/111, 95% CI: 52,1 %, 70,4 %), což je velmi podobné hodnotě 64,1 % pozorované u ORR v populaci ERAS se vzorky tkáně.

V populaci úplného souboru pro analýzu (FAS) pro tkáň (T790M-pozitivní pacienti podle testu **cobas** EGFR ve tkáni, kteří obdrželi alespoň jednu dávku přípravku TAGRISSO®) bylo 117 pacientů T790M-pozitivních podle testu **cobas** EGFR v plazmě. Parametr ORR pro pacienty s T790M-pozitivním výsledkem ve vzorcích tkáně i plazmy byl 61,5 % (72/117, 95% CI: 55,2 %, 73,7 %), což je také velmi podobný výsledek hodnotě 61 % pozorované u ORR v populaci FAS ve tkáni. Výsledky těchto analýz – viz Tab. 41. Vzhledem k tomu, že zařazení do studie AURA2 bylo založeno na pozitivních výsledcích testů, výsledné údaje pro pacienty (T790M plazma-pozitivní, T790M tkáň-negativní) nejsou v této studii k dispozici.

**Tab. 41** Objektivní míra odpovědi podle výsledku plazmy mezi zařazenými pacienty (T790M-pozitivní podle tkáně) ze studie AURA2

| Populace<br>(T790M-pozitivní<br>podle vzorku tkáně)                             | Výsledky testu cobas EGFR<br>ze vzorku plazmy | N   | Počet pacientů<br>s odpovědí (ORR) <sup>a</sup><br>n (%) | ORR<br>(95% CI)  |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------|------------------|
| Úplný soubor<br>k analýze ve tkáni<br>(FAS ve tkáni)                            | T790M-pozitivní (FAS v plazmě)                | 117 | 72 (61,5 %)                                              | (55,2 %, 73,7 %) |
|                                                                                 | T790M-negativní                               | 89  | 53 (59,6 %)                                              | (51,3 %, 73,0 %) |
|                                                                                 | Celkově (FAS ve tkáni)                        | 210 | 128 (61,0 %)                                             | (57,0 %, 70,8 %) |
| Soubor pro analýzu<br>s vyhodnotitelnou<br>odpovědí ve tkáni<br>(ERAS ve tkáni) | T790M-pozitivní (ERAS v plazmě)               | 111 | 72 (64,9 %)                                              | (52,1 %, 70,4 %) |
|                                                                                 | T790M-negativní                               | 83  | 52 (62,7 %)                                              | (48,6 %, 69,8 %) |
|                                                                                 | Celkově (ERAS ve tkáni)                       | 198 | 127 (64,1 %)                                             | (54,0 %, 67,6 %) |

<sup>a</sup> Odpovědi zahrnují pouze potvrzené odpovědi.

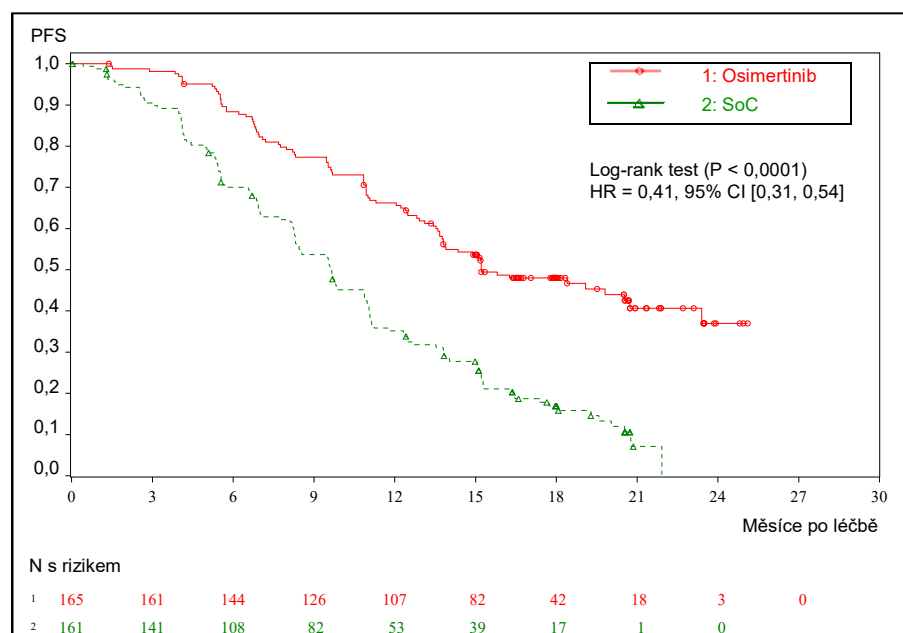
## FLAURA

### I. Klinické hodnocení fáze III pro první linii léčby přípravkem TAGRISSO®

Celkem 994 pacientů podstoupilo screening ve studii FLAURA<sup>10</sup> 556 pacientů bylo randomizováno do tohoto klinického hodnocení a 438 neprošlo screeningem. Z 556 randomizovaných pacientů do studie FLAURA bylo 537 způsobilých pro analýzu studie. Z 537 pacientů způsobilých ke studii bylo 276 randomizováno na základě centrálního testu tkáně **cobas** EGFR, z nichž u 254 byl k dispozici pro testování vzorek plazmy K2 EDTA a 190 bylo pozitivních na test plazmy **cobas** EGFR (pEGFRm+); 261 bylo randomizováno základě místního testu tkáně, z nichž u 242 byl k dispozici vzorek plazmy pro testování se 169 pozitivními výsledky na test plazmy **cobas** EGFR (136 pozitivních výsledků testu tkáně **cobas** EGFR (tEGFRm+), 1 negativní výsledek testu tkáně **cobas** EGFR (tEGFRm-) a 32 neplatných/netestovaných testem tkáně **cobas**).

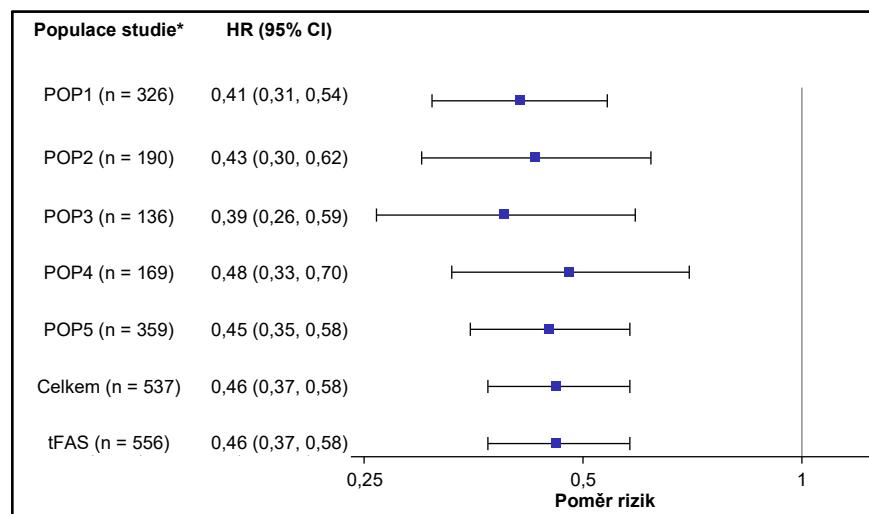
U primární populace plazmy (tEGFRm+ a pEGFRm+ dle testu **cobas** EGFR, N = 326, 190 centrálně randomizovaných a 136 místně randomizovaných) byl HR 0,41 (95% CI: 0,31, 0,54) a HR pro FLAURA FAS (tEGFRm+, N = 556) byl 0,46 (95% CI: 0,37, 0,58). Proto je účinnost přípravku u primární populace plazmy konzistentní s populací FLAURA FAS. Kaplan Meierova křivka pro primární populaci plazmy s delecí v exonu 19 nebo mutací L858R ve vzorku plazmy je znázorněna na obrázku (Obrázek 17).

**Obrázek 17** Kaplan-Meierova křivka PFS podle léčby pro primární populaci plazmy FLAURA (pacienti, jejichž výsledky byly **cobas** tEGFRm+ a **cobas** pEGFRm+, n = 326)



Superiorita přípravku TAGRISSO® oproti standardní léčbě byla konzistentní ve všech podskupinách s pozitivními výsledky plazmy definovanými dle místního a centrálního stavu zařazení **cobas** tEGFR, přičemž HR bylo v rozmezí od 0,39 do 0,48 a v souladu s HR získaným u populace FLAURA FAS (HR = 0,46), jak je znázorněno níže (Obrázek 18).

Obrázek 18 Forest graf pro HR u podskupin FLAURA definovaných podle místního a centrálního stavu testu cobas EGFR



POP = populace (podskupina).

\* POP1: všichni randomizovaní pacienti s pozitivním testem tkáně **cobas** a s pozitivním testem plazmy **cobas**.

POP2: Pacienti randomizovaní podle testu tkáně **cobas** a také pozitivní v testu plazmy **cobas**.

POP3: pacienti randomizovaní podle místního testu tkáně a také pozitivní v testu tkáně a plazmy **cobas**.

POP4: pacienti randomizovaní podle místního testu tkáně a také pozitivní v testu plazmy **cobas**.

POP5: všichni randomizovaní pacienti s pozitivním testem plazmy **cobas**.

Souhrnně: všichni randomizovaní pacienti kromě 19 pacientů z Číny.

tFAS: všichni randomizovaní pacienti (úplný soubor k analýze FLAURA).

## II. Analýza standardní léčby přípravkem IRESSA®

Samostatná analýza byla provedena u pacientů z ramene se standardní léčbou (SoC) léčených přípravkem IRESSA® (gefitinib). Ze všech pacientů léčených přípravkem IRESSA®, u nichž zkoušející vyhodnotil objektivní odpověď ve studii FLAURA, bylo 105 pacientů pozitivních podle testu **cobas** provedeného na plasmě ze vzorků K2 EDTA. ORR pro všechny pacienty s pozitivním výsledkem **cobas** pro plazmu bylo 71,4 % (75/105, 95% CI: 62,2 %, 79,2 %, POP4 – viz Tab. 42).

Ze 105 pacientů s pozitivními výsledky z testu plazmy **cobas** bylo 47 pacientů randomizováno dle testu tkáně **cobas** (primární populace účinnosti pro test plazmy **cobas**) a 58 pacientů bylo randomizováno dle místního testu. Celkem 36 pacientů bylo dle vyhodnocení zkoušejícího považováno za pacienty s odpovědí na léčbu (respondéry) v primární populaci účinnosti pro test plazmy **cobas** (n = 47), s výsledným ORR 76,6 % (95% CI: 62,8 %, 86,4 %, POP1 v Tab. 42).

ORR bylo 62,2 % (28/45, 95% CI: 47,6 %, 74,9 %) u místně randomizovaných pacientů, kteří byli pozitivní dle testu tkáně **cobas** i testu plazmy **cobas** (POP2 v Tab. 42). ORR bylo 69,6 % (64/92, 95% CI: 59,5 %, 78,0 %) u všech pacientů léčených přípravkem IRESSA®, kteří byli pozitivní dle testu tkáně **cobas** i testu plazmy **cobas** (POP3 v Tab. 42). Forest graf ORR u jiných populací pacientů je znázorněn na Obrázek 19. Výsledky naznačují, že léčebný účinek přípravku IRESSA® na základě testu plazmy **cobas** byl zachován v každé dílčí populaci a byl konzistentní s výsledky uváděnými v původní registrační studii (IFUM) u pacientů vybraných k léčbě přípravkem IRESSA®.<sup>13</sup>

Tab. 42 ORR pro pacienty léčené přípravkem IRESSA® ve studii FLAURA pozitivní na test plazmy

| Objektivní odpověď<br>na léčbu | Pacienti pozitivní na test plazmy (pEGFR+) v rameni SoC léčení přípravkem IRESSA® |                                             |              |                                         |                                              |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                | pEGFR+<br>randomizovaní<br>centrálně<br>(cobas tEGFR+)                            | pEGFR+ randomizovaní místně (Local tEGFR+)  |              |                                         | Celkem                                       |
|                                |                                                                                   | cobas tEGFR+                                | cobas tEGFR- | cobas tEGFR<br>Neplatné/<br>netestováno |                                              |
| Počet pacientů                 | 47                                                                                | 45                                          | 1            | 12                                      | 105                                          |
| Odpověď                        | 36                                                                                | 28                                          | 1            | 10                                      | 75                                           |
| Bez odpovědi                   | 11                                                                                | 17                                          | 0            | 2                                       | 30                                           |
| ORR (% , 95% CI)               | POP1 = 76,6 %<br>(36/47:<br>62,8 %, 86,4 %)                                       | POP2 = 62,2 %<br>(28/45:<br>47,6 %, 74,9 %) | -            | -                                       | POP4 = 71,4 %<br>(75/105:<br>62,2 %, 79,2 %) |
|                                | POP3 = 69,6 %<br>(64/92: 59,5 %, 78,0 %)                                          |                                             | -            | -                                       | -                                            |

Poznámka: tEGFR = tkáňový EGFR; pEGFR = plazmový EGFR; CI = (skóre) interval spolehlivosti.

POP = populace (podskupina).

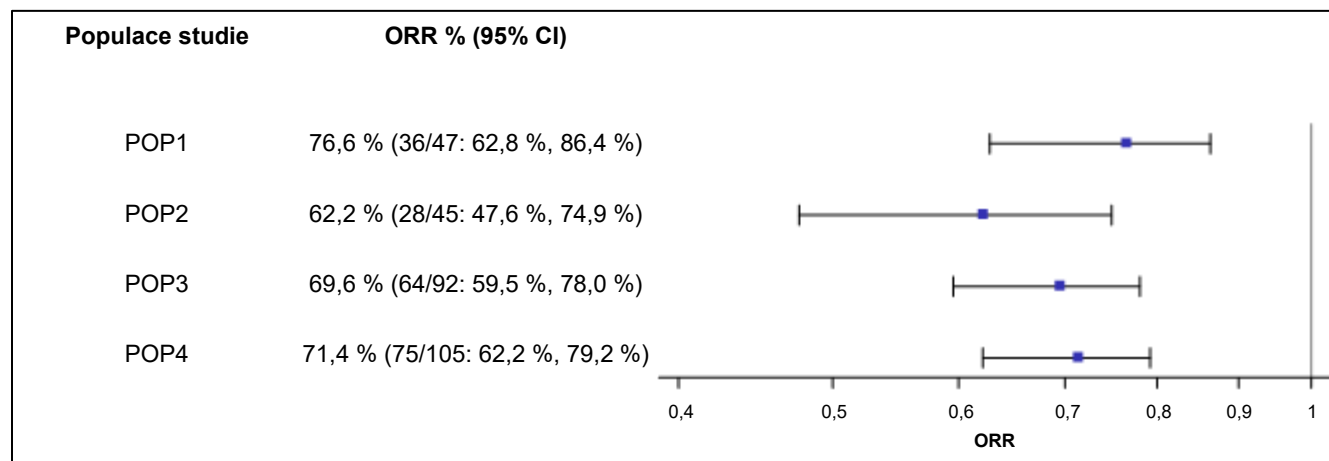
POP1: ORR pro pacienty **cobas** pEGFR+ randomizované podle testu tkáně **cobas** (primární populace účinnosti pro test plazmy **cobas**).

POP2: ORR pro pacienty pozitivní na test plazmy a tkáně **cobas** randomizované dle místního testu tkáně.

POP3: ORR pro všechny pacienty pozitivní na test plazmy a tkáně **cobas**.

POP4: ORR pro všechny pacienty pozitivní na test plazmy **cobas**.

Obrázek 19 Forest grafy ORR podle testu cobas EGFR v plazmě u různých populací



POP = populace (podskupina).

POP1: ORR pro pacienty **cobas** pEGFR+ randomizované podle testu tkáně **cobas** (primární populace účinnosti pro test plazmy **cobas**).

POP2: ORR pro pacienty pozitivní na test plazmy a tkáně **cobas** randomizované dle místního testu tkáně.

POP3: ORR pro všechny pacienty pozitivní na test plazmy a tkáně **cobas**.

POP4: ORR pro všechny pacienty pozitivní na test plazmy **cobas**.

# Značky výsledků

## Vysvětlení značek výsledků

Kód značky ukazuje příčinu značky; kódy uvádí Tab. 43.

Tab. 43 Příčina značky

| Kód značky začíná písmenem | Příčina značky            | Příklad |
|----------------------------|---------------------------|---------|
| M <sup>a</sup>             | Mnohočetné či jiné důvody | M6      |
| R                          | Interpretace výsledků     | R20     |
| Z <sup>a</sup>             | Analýzátor                | Z1      |

<sup>a</sup> Viz Návod k použití systému cobas® 4800 nebo Asistent uživatele systému cobas® 4800.

Tab. 44 uvádí všechny značky výsledků systému, které jsou relevantní pro uživatele.

Tab. 44 Seznam značek interpretace výsledků

| Kód značky                                                 | Závažnost | Popis                                     | Doporučený úkon                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| R797, R807, R817, R827, R837, R842, R847                   | Chyba     | Nelze detekovat žádný cíl                 | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> . Tyto kódy značek ukazují, že došlo k negativnímu výsledku vzorku (tj. vzorek nemusel být přidán do jedné nebo více jamek).                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| R700, R718, R724, R736, R742, R748, R766, R712, R754, R760 | Chyba     | Nelze detekovat kontrolu mutace           | Cyklus opakujte. Viz část <b>Postup testu</b> . Tyto kódy značek ukazují, že algoritmus pro určení ohybu zjistil chybu, která může nastat v případě atypického vzorce fluorescence nebo šumu.                                                                                                                                                                                                                                                        |
| R701, R719, R725, R737, R743, R749, R767, R713, R755, R761 | Chyba     | Nelze detekovat kontrolu mutace           | Cyklus opakujte. Viz část <b>Postup testu</b> . Tyto kódy značek ukazují, že vzorek měl negativní výsledek pro kontrolu mutace. Existuje možnost, že DNA kontrola mutace nebyla přidána do jedné či více jamek.                                                                                                                                                                                                                                      |
| R702, R720, R726, R738, R744, R750, R768, R714, R756, R762 | Chyba     | Kontrola mutace je mimo rozsah            | Cyklus opakujte. Viz část <b>Postup testu</b> . Tyto kódy značek ukazují, že pozorovaná hodnota Ct u kontroly mutace byla nad stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš vysoký). Možné důvody mohou být:<br>1. nesprávná příprava pracovního Master Mixu;<br>2. chyba pipetování při přidávání pracovního Master Mixu do jamky mikrotitrační destičky;<br>3. Chyba pipetování při přidávání kontroly mutace do jamky mikrotitrační destičky. |
| R703, R721, R727, R739, R745, R751, R769, R715, R757, R763 | Chyba     | Kontrola mutace je mimo rozsah            | Cyklus opakujte. Viz část <b>Postup testu</b> . Tyto kódy značek ukazují, že pozorovaná hodnota Ct u kontroly mutace byla pod stanovenou prahovou hodnotou (tj. ohyb byl příliš nízký). Tato chyba se může vyskytnout v případě kontaminace DNA.                                                                                                                                                                                                     |
| R772, R778, R780, R784, R786, R788, R794, R776, R790, R792 | Chyba     | Negativní kontrola nemohla být detekována | Cyklus opakujte. Viz část <b>Postup testu</b> . Tyto kódy značek ukazují, že algoritmus pro určení ohybu zjistil chybu, která může nastat v případě atypického vzorce fluorescence nebo šumu.                                                                                                                                                                                                                                                        |
| R773, R779, R781, R785, R787, R789, R795, R777, R791, R793 | Chyba     | Negativní kontrola je mimo rozsah         | Cyklus opakujte. Viz část <b>Postup testu</b> . Tyto kódy značek ukazují, že negativní kontrola měla pozitivní výsledek (tj. došlo ke kontaminaci).                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

| Kód značky                               | Závažnost | Popis                                   | Doporučený úkon                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| R796, R816, R826, R836, R806, R841, R846 | Chyba     | Nelze detekovat žádný cíl               | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> .<br>Tyto kódy značek ukazují, že algoritmus pro určení ohybu zjistil chybu, která může nastat v případě atypického vzorce fluorescence nebo šumu.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| R799, R819, R829, R839, R809, R844, R849 | Chyba     | Výsledek je mimo rozsah                 | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> .<br>Tyto kódy značek ukazují, že u vzorku byla pozorována atypicky nízká hodnota Ct.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| R800, R820, R830, R840, R810, R845, R850 | Chyba     | Výsledek je mimo rozsah                 | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> .<br>Tyto kódy značek ukazují, že u vzorku byl pozorován atypický vztah mezi hodnotou Ct mutace a Ct vnitřní kontroly.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| R811, R831, R851                         | Chyba     | Vnitřní kontrola nemohla být detekována | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> .<br>Tyto kódy značek ukazují, že algoritmus pro určení ohybu zjistil chybu, která může nastat v případě atypického vzorce fluorescence nebo šumu.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| R812, R832, R852                         | Chyba     | Vnitřní kontrola nemohla být detekována | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> .<br>Tyto kódy značek ukazují, že výsledek vnitřní kontroly vzorku nebyl platný. Nepřítomnost platného výsledku vnitřní kontroly může znamenat následující:<br>1. špatnou kvalitu genomické DNA ze vzorku;<br>2. nevhodné zpracování vzorku;<br>3. přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku;<br>4. výskyt vzácných mutací v oblastech genomické DNA pokrytých vnitřní kontrolou primerů a/nebo sondami;<br>5. možnost, že DNA vzorků nebyla přidána do jedné či více jamek;<br>6. jiné faktory. |
| R813, R834, R853                         | Chyba     | Vnitřní kontrola mimo rozmezí testu     | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> .<br>Tyto kódy značek ukazují, že výsledek vnitřní kontroly vzorku nebyl platný. Nepřítomnost platného výsledku vnitřní kontroly může znamenat následující:<br>1. špatnou kvalitu genomické DNA ze vzorku;<br>2. nevhodné zpracování vzorku;<br>3. přítomnost inhibitorů PCR ve vzorku;<br>4. výskyt vzácných mutací v oblastech genomické DNA pokrytých vnitřní kontrolou primerů a/nebo sondami;<br>5. možnost, že DNA vzorků nebyla přidána do jedné či více jamek;<br>6. jiné faktory. |
| R814, R835, R854                         | Chyba     | Vnitřní kontrola mimo rozmezí testu     | Opakujte vzorek. Viz část <b>Postup testu</b> .<br>Tyto kódy značek ukazují, že u vzorku byla pozorována atypicky nízká hodnota Ct vnitřní kontroly. Tato chyba může nastat pokud je směs PCR přeplněna koncentrovanou genomickou DNA.                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

# Doplňující informace

## Symbole

V označování diagnostických produktů společnosti Roche PCR se používají následující symboly.

Tab. 45 Symbole použité při označování diagnostických produktů PCR společnosti Roche

|                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                |                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Age/DOB</b> Věk nebo datum narození                                                                                                                                                                                            |  Prostředek není pro testování u lůžka pacienta                               | <b>QS IU/PCR</b> Kopie IU na reakci PCR, použijte mezinárodní jednotky (UI) QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.            |
|  Pomocný software                                                                                                                                |  Prostředek není určen pro samotestování                                      | <b>SN</b> Sériové číslo                                                                                                       |
| <b>Assigned Range [copies/mL]</b> Přiřazené rozmezí (kopie/mL)                                                                                                                                                                    |  Distributor<br>(Pozn.: pod symbolem může být uvedena příslušná země/oblast.) | <b>Site</b> Pracoviště                                                                                                        |
| <b>Assigned Range [IU/mL]</b> Přiřazené rozmezí (IU/mL)                                                                                                                                                                           |  Nepoužívejte opakovaně                                                       | <b>Procedure Standard</b> Standardní postup                                                                                   |
| <b>EC REP</b> Zplnomocněný zástupce pro evropské společenství                                                                                                                                                                     |  Žena                                                                         | <b>STERILE EO</b> Sterilizováno ethylenoxidem                                                                                 |
| <b>BARCODE</b> Datový list s čárovými kódy                                                                                                                                                                                        |  Pouze pro vyhodnocení výkonnosti IVD                                         |  Uchovávejte v temnu                       |
| <b>LOT</b> Číslo šarže                                                                                                                                                                                                            | <b>GTIN</b> Globální číslo obchodní položky                                                                                                                    |  Omezení teploty                          |
|  Biologická rizika                                                                                                                              |  Dovozece                                                                    |  Definiční soubor testu                  |
| <b>REF</b> Katalogové číslo                                                                                                                                                                                                       | <b>IVD</b> Zdravotnický prostředek pro <i>in vitro</i> diagnostiku                                                                                             |  Neklopit                                |
|  Značka shody CE. Tento prostředek odpovídá příslušným požadavkům pro značku shody CE pro diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i> | <b>LLR</b> Dolní mez přiřazeného rozmezí                                                                                                                       | <b>Procedure UltraSensitive</b> Ultracitlivý postup                                                                           |
| <b>Collect Date</b> Datum odběru                                                                                                                                                                                                  |  Muž                                                                        | <b>UDI</b> Jedinečná identifikace prostředku                                                                                  |
|  Čtěte návod k použití                                                                                                                         |  Výrobce                                                                    | <b>ULR</b> Horní mez přiřazeného rozmezí                                                                                      |
|  Obsah vystačí pro $<n>$ testů                                                                                                                 | <b>CONTROL -</b> Negativní kontrola                                                                                                                            | <b>Urine Fill Line</b> Hladina pro naplnění moči                                                                              |
| <b>CONTENT</b> Obsah soupravy                                                                                                                                                                                                     |  Nesterilní                                                                 | <b>Rx Only</b> Pouze pro USA: podle federálního zákona smí být tento přístroj prodáván pouze lékařem nebo na jeho objednávku. |
| <b>CONTROL</b> Kontrola                                                                                                                                                                                                           |  Jméno pacienta                                                             |  Datum expirace                          |
|  Datum výroby                                                                                                                                  |  Číslo pacienta                                                             |                                                                                                                               |
|  Prostředek pro testování u lůžka pacienta                                                                                                     |  Zde odloupnout                                                             |                                                                                                                               |
|  Prostředek pro samotestování                                                                                                                  | <b>CONTROL +</b> Pozitivní kontrola                                                                                                                            |                                                                                                                               |
|                                                                                                                                                                                                                                   | <b>QS copies / PCR</b> Kopie QS na reakci PCR, použijte kopie QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.                                                           |                                                                                                                               |

## Technická podpora

Pro technickou podporu (asistenci) kontaktujte místní zastoupení:  
[https://www.roche.com/about/business/roche\\_worldwide.htm](https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm)

## Výrobce

### Tab. 46 Výrobce

Vyrobeno ve Spojených státech



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany  
[www.roche.com](http://www.roche.com)

Vyrobeno v USA

## Ochranné známky a patenty

Viz <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

## Autorská práva

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.

## Literatura

1. Sharma S. V., Bell D. W., Settleman J., Haber D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-81.
2. Pao W., Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):760-774.
3. Zhou C., Wu Y. L., Chen G., Feng J., Liu X. Q., Wang C., et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8):735-42.
4. Paz-Ares L., Soulieres D., Melezinek I., Moecks J., Keil L., Mok T., et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):51-69.
5. Cheng L., Alexander R. E., Maclennan G. T., Cummings O. W., Montironi R., Lopez-Beltran A., et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol*. 2012;25(3):347-69.
6. TARCEVA® (erlotinib) Package Insert.
7. Wu Y. L., Lee J. S., Thongprasert S., Yu C. J., Zhang L., Ladrera G., et al. Intercalated combination of chemotherapy and erlotinib for patients with advanced stage non-small-cell lung cancer (FASTACT-2): a randomised, double-blind trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(8):777-86.
8. TAGRISSO® (osimertinib) Package Insert.
9. Janne P. A., Yang J. C., Kim D. W., Planchard D., Ohe Y., Ramalingam S. S., et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(18):1689-99.
10. Soria J-C, Vansteenkiste J, Reungwetwantana T, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 2018; 378:113-125.
11. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD, Jr, Morse D, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 2004;10(4):1212-1218.
12. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu, Saijo, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361(10):947-957.
13. Douliard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br. J Ca* 2014;110:55-62.
14. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), 2011, v.51.  
<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>.
15. Longo M. C., Berninger M. S., Hartley J. L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93(1):125-8.
16. Chosewood LC, Wilson DE. Biosafety and microbiological and biomedical laboratories-Fifth Edition. US Department of Health and Human Services Publication. (CDC). 2009:21-1112.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA;CLSI, 2014.

18. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 52nd Edition. 2011.
19. Costa D. B., Nguyen K. S., Cho B. C., Sequist L. V., Jackman D. M., Riely G. J., et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(21):7060-7.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. CLSI Document EP17-A2: Wayne, PA; CLSI, Jun 2012.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference testing in clinical chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI Document EP07-A2 Appendix D: Wayne, PA; CLSI, 2005.
22. Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-46.
23. Goss G., Tsai C. M., Shepherd F. A., Bazhenova L., Lee J. S., Chang G. C., et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(12):1643-52.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved Guideline. CLSI Document EP-06A: Wayne, PA; CLSI, Apr 2003.

## Revize dokumentu

| Informace k revizi dokumentu |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Doc Rev. 8.0<br>07/2023      | <p>V oddílu <b>Potřebné vybavení a software, které není součástí dodávky</b> v částech <b>Oddíl A</b> a <b>Oddíl B</b> byla verze softwaru systému aktualizována na 2.2 a byl přidán odkaz ke kartě s informacemi o výrobku.</p> <p>Bylo aktualizováno označení značkou <b>cobas®</b>.</p> <p>Byl aktualizován oddíl <b>Ochranné známky a patenty</b> včetně odkazu.</p> <p>Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.</p> |